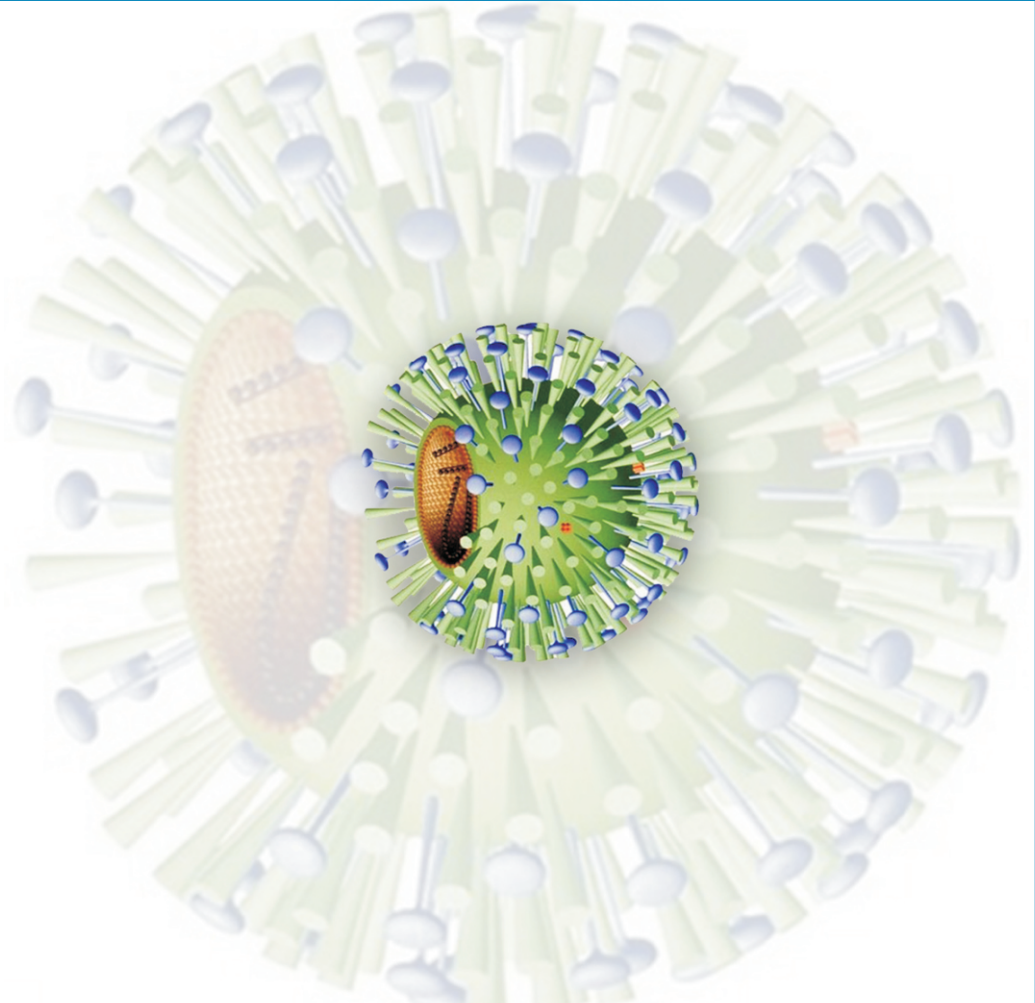


DIAGNOSTICO DE VIRUS INFLUENZA EN MAMÍFEROS Y AVES



DIAGNOSTICO DE VIRUS INFLUENZA EN MAMÍFEROS Y AVES



**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud

Salud Pública Veterinaria
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa

Catalogación de la fuente:

Centro Panamericano de Fiebre Aftosa.

Diagnóstico de virus de Influenza en mamíferos y aves. Rio de Janeiro:
PANAFTOSA-OPS/OMS, 2010.

63 p. (Serie de Manuales Técnicos, 16)

ISSN 0101-6970

1. Virus de Influenza 2. Salud pública veterinaria. I. Organización
Panamericana de la Salud. II. Título.

CONTENIDO

Introducción	05
1 Procedimientos de Laboratorio para el Diagnostico de Virus Influenza en Mamíferos y Aves	07
2 Colección, preservación y transporte de muestras	09
3 Preparación de muestras para Aislamiento Viral	11
4 Aislamiento Viral de Huevos Embrionados de Gallina	16
5 Aislamiento de virus influenza en cultivos celulares	19
6 Identificación de virus influenza por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA)	23
7 Identificación de los virus influenza por las técnica de amplificación genética parcial por la enzima polimerasa (RT-CPR)	31
▪ Extracción de ácidos nucleicos	32
▪ rt RT-PCR para detección de Influenza A, Influenza A suina y H1 Pandémica. Protocolo de la OMS	35
▪ rt RT-PCR para detección de Influenza A, Influenza A, H5 y H7aviar de alta patogenicidad. Protocolo recomendado por OIE	40
8 Diagnostico serológico de virus influenza	45
9 Técnica de Inmunodifusión en Agar (IDA) Utilizando el Antígeno de ola NP para la Determinación de Anticuerpos para Influenza Tipo A	46
10 Técnica de Inhibición de la Hemaglutinación (IHA) para la Detección de Anticuerpos para Subtipo de Hemaglutinina (H)	48
11 Referencias Bibliográficas	50
12 APENDICE I - Normas estándar de bioseguridad	51
13 APENDICE II Pruebas diagnosticas disponibles en laboratorios de referencia:	
▪ Prueba de la neuraminidasa y del la inhibición de la neuraminidasa	52
▪ Prueba de virulencia de virus influenza a aviar	61
14. APENDICE III. Laboratorios de Referencia de la OIE en America	64

INTRODUCCIÓN

Influenza es una enfermedad infecciosa que afecta a las aves y mamíferos y es causada por los virus influenza. Estos virus pertenecen a la familia *Orthomyxoviridae* la cual incluye el genero Influenza que comprende tres tipos A, B y C y el genero Togotavirus (virus de garrapatas).

Los virus influenza son virus ARN de simple cadena de polaridad negativa y genoma segmentado. Tienen un diámetro de 120 nm con apariencia pleomorfica y poseen una envoltura lipoproteica. De la superficie viral se proyectan dos tipos de glicoproteínas: la hemaglutinina (HA o H) y la neuraminidasa (NA o N), estas glicoproteínas confieren propiedades biológicas muy importantes al virus tales como: la inducción de inmunidad en el huésped y facilitar el proceso infeccioso a nivel celular. Basada en la antigenicidad de estas glicoproteínas los virus influenza han sido subdivididos en 16 subtipos de H (H1-H16) y 9 N (N1-N9). En la denominación de los virus influenza incluye el tipo (A o B), la especie de huésped (excepto los virus humanos), el sitio geográfico donde fue identificado el virus, el número de aislamiento, el año y en paréntesis el subtipo de H y N, por ejemplo: A/goose/Guangdong/1/96 (H5N1).

Todos los subtipos de virus influenza A han sido encontrados en aves acuáticas y pueden afectar la aves domesticas causando generalmente infecciones asintomáticas o muy leves. Sin embargo algunas variantes de los subtipos H5 y H7 son de altamente patogénicos (HPAI) causando enfermedad sistémica en aves silvestres y domesticas. Estas variantes pueden afectar al hombre y potencialmente pueden causar pandemias.

La infección por los virus influenza en el humano puede cursar con manifestaciones clínicas leves siendo los síntomas más comunes escalofrío, fiebre, dolor de cabeza dolores musculares, dolor de garganta y tos. En los casos más severos los virus influenza pueden causar neumonía.

Los virus influenza son transmitidos típicamente por aerosoles producidos por la tos o estornudo. En aves a través de la contaminación de agua y fomites con secreciones nasales o heces. El virus puede inactivarse rápidamente por la luz solar desinfectantes o detergentes.

La población humana ha sido afectada durante los últimos 90 años por los subtipos de virus influenza A H1N1, H2N2 y H3N2 causando epidemias de enfermedad respiratoria estacional cada año en la población, siendo los subtipos H1N1 y H3N2 prevalentes en los últimos 40 años. Las epidemias emergen debido a la ocurrencia de mutaciones puntuales en las dos glicoproteínas superficiales H y N inducidas por presión inmunológica de la población, la acumulación de mutaciones dan lugar a la emergencia de nuevas variantes antigénicas que no son reconocidas por las defensas del huésped que han sido inducidas por las variables previas. Estos cambios continuos en la antigenicidad de los virus influenza son denominados “drift antigénico”.

La transmisión de los virus influenza A de humanos a aves y cerdos puede ocurrir ocasionalmente y en esta ultima especie puede ocurrir la reasociación de genes de virus influenza cuando el animal esta co-infectado por 2 virus influenza A de diferentes especies y así se genera un nuevo subtipo

viral con potencial pandémico, este fenómeno de reasociación de genes virales es denominado “shift antigénico”.

En contraste a las epidemias, las pandemias ocurren por la emergencia de una nueva subtipo de virus influenza A contra la cual no existe inmunidad en la población. Un nuevo subtipo de virus influenza puede emerger por adaptación de subtipos aviares o mamíferos para su transmisión al humano o por la reasociación genética de virus animales y humanos en cerdos como se menciona anteriormente. En el siglo XX ocurrieron pandemias en 1918-1919 causada por el virus H1N1, en 1957 por la cepa H2N2 y en 1968 por la cepa H3N2. En abril del 2009 se identificó una nueva cepa de virus Influenza A H1N1 que emergió por la reasociación genética de virus influenza A de humano, cerdo y aves. La Organización Mundial de la Salud (OMS) lanzó la Alerta de Pandemia fase 5 el 28 de abril del 2009, indicando que el nuevo virus se había diseminado en varias regiones del mundo y para Junio se elevó a la fase 6 indicando Pandemia Global. Durante el 2009-2010 el 90% de las infecciones de influenza fueron asociadas al subtipo H1N1 pandémico y más de 214 países confirmaron casos, se estima que ocurrieron aproximadamente 61 millones de casos, 274.000 hospitalizaciones y 12.470 muertes. En la actualidad existen evidencias que el virus está entrando en un patrón de transmisión estacional por lo que la OMS declaró entrar en la fase Post Pandémica el 10 de agosto del 2010.

El virus influenza subtipo H1N1 porcino clásico ha venido afectando la población porcina a nivel mundial desde 1930. Otros subtipos que infectan comúnmente son el cerdo H3N2 y H1N2 variantes europeas y americanas. Los virus influenza suina comúnmente son introducidos en un rebaño por un cerdo infectado y permanece endémico por medio del movimiento de animales y la mezcla de infectados con susceptibles. La infección puede transcurrir en forma sintomática o manifestaciones clínicas leves caracterizadas por: anorexia, depresión, fiebre, tendencia de acumularse en pilas y los signos respiratorios se hacen evidentes con el movimiento.

La co-circulación de múltiples subtipos de virus influenza A en aves, porcinos y humanos, la emergencia y endemicidad de la cepa (H5N1) altamente patogénica en el Sureste asiático así como la emergencia de la cepa pandémica H1N1 y la transmisión ocasional de variantes aviares y humanas en poblaciones de porcinos constituyen un riesgo significativo para la emergencia de nuevos subtipos de virus influenza A con potencial pandémico. Esta situación representa un reto muy importante para el diagnóstico e identificación oportuna de subtipos de virus influenza A emergentes.

El presente documento reúne todos los protocolos de las técnicas de laboratorio tanto serológicas, virológicas, y moleculares, como también los estudios de patogenicidad disponibles para el diagnóstico de la Influenza, abarcando las cepas aviares y suinas incluyendo la pandémica H1N1 2009.

1. PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO PARA EL DIAGNOSTICO DE VIRUS INFLUENZA EN MAMÍFEROS Y AVES

Los procedimientos de diagnóstico del virus influenza se pueden clasificar en:

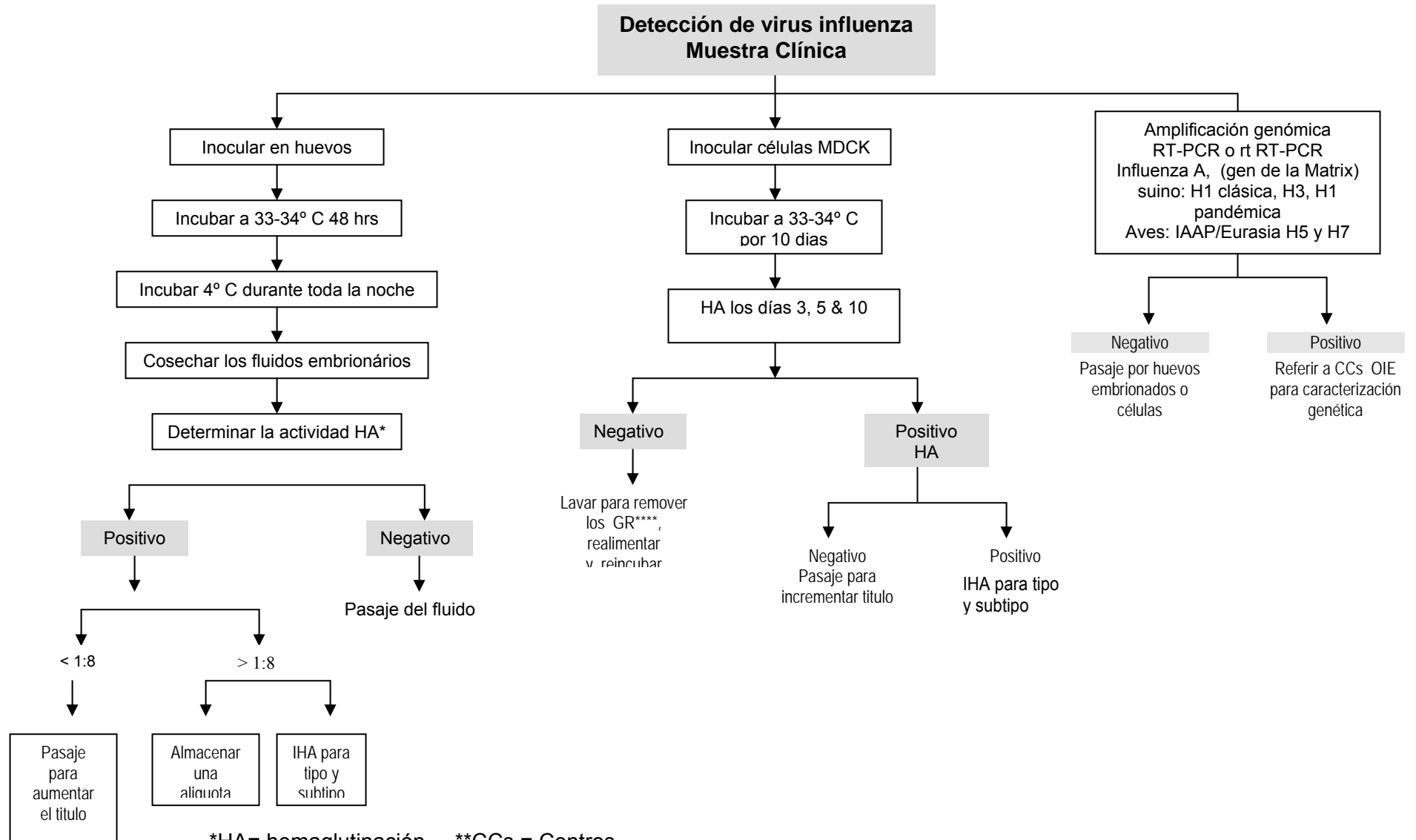
1. Diagnóstico virológico basados en detección del agente viral por: aislamiento en cultivos celulares o huevos embrionados, detección de antígeno y amplificación parcial del genoma viral por RT-PCR.
2. Diagnóstico serológico basados en la detección y medida de niveles de anticuerpos en sueros pareados utilizando las técnicas de inmunodifusión en agar (IDA), ensayo inmuno enzimático (ELISA) o inhibición de la hemaglutinación (IHA).

Las técnicas convencionales de aislamiento e identificación viral así como la determinación de anticuerpos son muy sensibles y específicas sin embargo tienen la desventaja que requieren una o más semanas para su obtener resultados además se debe disponer de instalaciones físicas de contención biológica nivel 3 o 4 para el manejo de subtipos de virus emergentes.

En los últimos años se han desarrollado estuches comerciales de ELISA en formato captura de antígeno que permiten la detección de antígeno de virus influenza A en las muestras clínicas. La mayoría de los estuches usan anticuerpo monoclonal contra la nucleoproteína (NP), pueden realizarse sin equipo especial de laboratorio y los resultados pueden estar disponibles en 15-20 minutos. La mayor desventaja es la falta de sensibilidad y no han sido validados para todas las aves y mamíferos

Actualmente se dispone de métodos moleculares de RT-PCR y secuenciación genómica que son métodos rápidos con alta sensibilidad y especificidad que permiten detectar el virus directamente en la muestra clínica así como su caracterización genética y su manipulación requieren contención biológica nivel 2 utilizando normas de seguridad nivel 3. Sin embargo la técnica de RT-PCR desarrollada para los subtipos y variantes circulantes puede tener una reducida o no sensibilidad para la detección de nuevos subtipos o variantes debido a la alta variabilidad genética especialmente en los genes de la H y N, por lo que deben diseñarse y validarse nuevos protocolos con partidores (primers) y sondas basados en las secuencias genéticas de cepas de virus influenza A emergentes.

Basada en estas observaciones se recomienda que los laboratorios de diagnóstico de influenza tengan disponibles las técnicas convencionales y las moleculares para asegurar un diagnóstico confiable.



*HA= hemaglutinación.. **CCs = Centros Colaboradores de Influenza de la OIE

2. COLECCIÓN, PRESERVACIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS

El éxito del diagnóstico de laboratorio depende de la calidad de la muestra y de las condiciones de preservación y transporte al laboratorio. Las muestras para la detección del virus influenza deben ser tomadas generalmente durante los primeros 3 días del inicio de la enfermedad. En humanos y mamíferos el virus influenza causa infecciones respiratorias mientras que en aves puede causar infección del tracto respiratorio y gastrointestinal por lo que el tipo de muestras recomendadas son las siguientes:

Tipo de muestras para diagnóstico

1. Mamíferos y aves vivas:

- Tracto respiratorio alto: hisopado nasal, orofaringe, traquea
- Aves: hisopado cloacal, heces. Es recomendable coleccionar hisopados cloacales de aves vivas o carcasas frescas

2. Mamíferos muertos:

- Tracto respiratorio alto bajo: lavado bronqueo-alveolar, hisopado traqueal, pulmón

3. Aves muertas

- Cerebro, corazón, pulmón, bazo, hígado, riñón
-

Material requerido para la toma de muestras:

1. Hisopos estériles de poliéster o dacron con palillo de plástico o aluminio
2. Viales estériles de 1-3 ml de plástico con tapa de rosca
3. Instrumental quirúrgico para colecta de tejidos
4. Medio de transporte viral comercial o preparado en el laboratorio de la siguiente manera:

Medio de transporte viral

1 litro de PBS o medio de cultivo celular suplementado con:

- | | |
|------------------------------|---------------|
| i. Seroalbumina bovina | 0,5% |
| ii. Penicilina G | 2X 106U/lt, |
| iii. Polimicina B | 2X106 U/lt, |
| iv. Gentamicina | 250 mg/lt |
| v. Nistatina | 0,5 X106 U/lt |
| vi. Ofloxacin HCL | 60 mg/lt |
| vii. Sulfametazole | 0,2g/lt |

Esterilizar por filtración, distribuir en los viales en volúmenes de 2-3ml y almacenar en refrigeración

Preparación para la colección de muestras:

1. Rotular los viales con el número de campo, tipo de muestra y la fecha de toma.
2. Llenar la información contenida en la ficha de campo, la cual debe incluir como mínimo: tipo de animal especie, tipo de muestra, localidad y fecha.
3. Use equipo de protección personal para la toma de muestras: mascararas N95, guantes de latex, bata, lentes y gorro.

Procedimiento para colección de muestras:

1. Hisopados nasales:
 - a. Insertar el hisopo en la cavidad nasal paralelo al paladar en dirección dorsal medial evitando tocar la piel.
 - b. Retirar el hisopo lentamente con rotación frotando la mucosa nasal.
 - c. Utilizar el mismo hisopo para colectar la muestra de la otra cavidad nasal.
 - d. Colocar el hisopo en el medio de transporte viral y partir el palillo y cerrar herméticamente el vial.
2. Hisopado de la orofaringe
 - a. Frotar vigorosamente la mucosa de la faringe posterior
 - b. Colocar el hisopo en el medio de transporte viral y partir el palillo y cerrar herméticamente el vial
3. Hisopados traqueales:

En aves vivas:

 - a. Inserte el hisopo y frote cuidadosamente la pared de la traquea
 - b. Colocar el hisopo en el medio de transporte viral y partir el palillo y cerrar herméticamente el vial

En aves sacrificadas el hisopado puede colectarse después de remover el pulmón y la traquea.

 - a. Usando guantes sostenga la traquea e inserte el hisopo a la máxima longitud y frotar vigorosamente la pared
 - b. Colocar el hisopo en el medio de transporte viral y partir el palillo y cerrar herméticamente el vial

4. Hisopados cloacales de aves vivas:

- a. Insertar el hisopo profundamente en el conducto y frote vigorosamente la pared. El hisopo debe contener restos fecales
- b. Colocar el hisopo en el medio de transporte viral y partir el palillo y cerrar herméticamente el vial

5. Muestras fecales:

- a. Colectar Con el hisopo muestras de heces frescas depositadas en el campo por aves silvestres o en las jaulas aves domesticas.
- b. Colocar el hisopo en el medio de transporte viral y partir el palillo y cerrar herméticamente el vial.

6. Muestras de tejido:

- a. Asépticamente remover el tejido fresco separar un trozo con tijeras estériles
- b. Colocar el trozo de tejido en un recipiente con tapa de rosca previamente rotulado
- c. Cada tejido debe ser colectarse en recipientes separados

7. Suero

- a. En mamíferos y aves vivas enfermas colectar una muestra de sangre 3-5 ml de sangre en la fase aguda de la enfermedad (<7 días) y otra muestra en la fase convaleciente (2-4 semanas después).
- b. Dejar retraer el coagulo de la sangre y centrifugar a 2.500 rpm por 15 minutos
- c. Transferir el suero a un vial estéril y descartar el coagulo en un recipiente para desinfección

Preservación de muestras

Las muestras para detección de virus deben ser mantenidas en refrigeración y ser transportadas inmediatamente al laboratorio. Las muestras que son enviadas después de 48-72 horas deben conservarse a – 70°C o menos. Debe evitarse el congelamiento y descongelamiento para reducir la perdida de infectividad

El suero puede conservarse a 4°C hasta por una semana, para periodos mas largos se recomienda congelar a -20°C

Empaque de muestras para el transporte al laboratorio

Transporte terrestre:

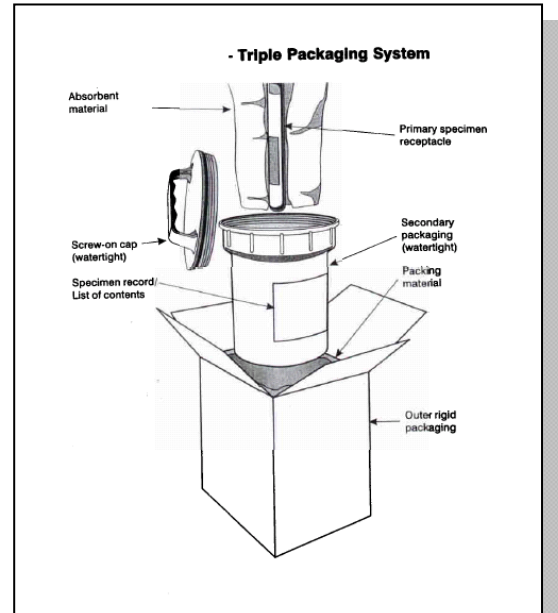
1. Cubrir el recipiente de cada muestra con papel absorbente y colócarlo en una bolsa plástica con cierre emético.

2. Colocar la bolsa de la (s) muestra (s) en la caja térmica con suficiente hielo para asegurar la refrigeración durante el transporte
3. Dar instrucciones al personal de transporte sobre el contenido del paquete

Transporte aéreo

El empaque de la (s) muestra (s) debe ser realizado por personal certificado por la IATA

1. Colocar la bolsa de las muestras en el recipiente indicado por las Naciones Unidas:
2. Rotular el paquete como “Muestras para Diagnóstico” UN 3373
3. Colocar el recipiente en la caja térmica conteniendo hielo seco
4. Preparar una lista detallada del contenido del paquete siguiendo las instrucciones de la IATA



Precauciones

Utilice equipo de protección personal

- Mono
- Guantes
- Botas de goma
- Mascara (N95)
- Lentes

Proteja el ambiente:

Desinfecte todo el material o superficies contaminadas



3. PREPARACIÓN DE MUESTRAS PARA AISLAMIENTO VIRAL

Introducción

Las muestras clínicas tales como heces, secreciones respiratorias y tejidos están contaminadas con flora normal y puede contener detritus celulares que pueden interferir en la multiplicación viral, por lo que deben tratarse con antimicrobianos y clarificarse por centrifugación antes de la inoculación en cultivos celulares o huevos embrionados.

Equipo

1. Gabinete de bioseguridad
2. Centrifuga refrigerada
3. Vortex
4. homogenizadores o morteros
5. Equipo de protección personal: guantes, bata de laboratorio, mascararas

Materiales

1. Gradillas
2. Tubos con tapa de rosca estériles 5 y de 15 ml
3. Viales de 2ml con tapa de rosca
4. Pipetas serológicas de 1, 5, 10 ml
5. Marcador
6. Alcohol de 70%
7. Hipoclorito al 5%

Reactivos

1. Medio de transporte viral
2. Solución de antibióticos (100 U/ml penicilina y 100 g/ml estreptomicina)
3. Alumndum o arena estéril

Recomendaciones de bioseguridad

1. Utilizar equipo de protección personal: guantes, bata, mascara y guantes

2. Realizar todo el proceso de preparación de las muestras en el gabinete de bioseguridad ya que se pueden crear aerosoles conteniendo patógenos del tracto respiratorio
3. Aplicar las normas de bioseguridad universal cuando manipule muestras y utilizar precauciones especiales si se sospecha de virus influenza de alta patogenicidad o nuevos subtipos virales.
4. Sustituir en lo posible el material de vidrio por material de plástico descartable.
5. Eliminar recipientes pipetas y puntas contaminadas en bolsas para autoclave.
6. Descontaminar inmediatamente los desechos líquidos conteniendo material infeccioso con hipoclorito de sodio o por autoclave.
7. Centrifugar utilizando soportes con tapa de seguridad. Abrir los tubos de centrifuga en el gabinete de bioseguridad.
8. Desinfectar las superficies de trabajo después de la finalizar el análisis o después de un derrame accidental.
9. Evite las contaminaciones cruzadas:
 - Nunca procese muestras clínicas y virus adaptado en el laboratorio al mismo tiempo
 - Nunca procese muestras clínicas humanas, de mamíferos o aves en el mismo laboratorio

Preparación de las muestras de hisopados

1. Mezclar la muestra en el vortex, remover el hisopo presionando contra la pared del tubo y descartarlo en un recipiente conteniendo solución desinfectante (hipoclorito de sodio al 5%)
2. Transferir la muestra con una pipeta estéril a un tubo de 5ml previamente rotulado.
3. Añadir 50 ul de la mezcla antibióticos a cada muestra
4. Centrifugar a 2.500 rpm por 20-30 minutos
5. Transferir el sobrenadante con una pipeta estéril a un vial de 2ml previamente rotulado
6. Conservar la muestra en refrigeración hasta ser inoculada (24 horas)
7. Almacenar la muestra a -70°C después de su inoculación para estudios posteriores

Preparación de muestras tejidos

1. Cortar el tejido en pequeños trozos (1x1mm) utilizando tijeras estériles
2. Almacenar a 70°C el tejido remanente para estudios posteriores
3. Colocar el tejido en un mortero conteniendo aproximadamente 1/2 gr. de alumndum o arena estéril, añadir 1-2 ml de medio de transporte viral y macerarlo.
4. Transferir el sobrenadante con una pipeta estéril a un tubo de centrifuga previamente rotulado

5. Centrifugar a 2500 rpm por 30 minutos
6. Transferir el sobrenadante con una pipeta estéril a un vial previamente rotulado
7. Conservar la muestra en refrigeración hasta ser inoculada (24 horas)
8. Almacenar la muestra a -70°C después de su inoculación para estudios posteriores.

4. AISLAMIENTO VIRAL DE HUEVOS EMBRIONADOS DE GALLINA

Introducción

El aislamiento en cultivos celulares o huevos embrionados y la subsecuente identificación mediante técnicas inmunológicas o genéticas son los métodos mas sensibles para el diagnostico de infecciones virales cuando dispone de muestras de buena calidad. Una de las mayores ventajas es que se dispone del virus a nivel del laboratorio para futuras investigaciones sobre la composición antigénica y caracterización genética, preparación de vacunas y estudios de resistencia antiviral.

Los huevos embrionados de gallina fueron uno de los primeros métodos utilizados en el aislamiento viral y continúan siendo uno de los métodos mas sensibles para el aislamiento de virus influenza aviar, no siendo así para todos los virus de influenza humana o cerdos por lo que se recomienda utilizar además cultivos celulares para asegurar mayor sensibilidad en el diagnostico.

Equipo

1. Gabinete de bioseguridad
2. Centrifuga refrigerada
3. Ovoscopio
4. Incubador a 35-37
5. Vortex
6. Equipo de protección personal: guantes, bata de laboratorio, mascararas

Materiales

1. Huevos embrionados de gallina de 9-10 días libres de patógenos o de anticuerpos para virus influenza
2. Perforador de huevos
3. Jeringas de tuberculina
4. Agujas de calibre 22 x1 ½ pulgada
5. Pinzas
6. Gradillas
7. Tubos con tapa de rosca estériles 5 y de 15 ml
8. Viales de 2ml con tapa de rosca
9. Pipetas serológicas de 1, 5, 10 ml.
10. Recipiente para descartar material punzo penetrante
11. Goma
12. Marcador
13. Alcohol de 70%

Recomendaciones de bioseguridad

1. Utilizar equipo de protección personal: guantes, bata, máscara y guantes
2. Realizar todo el proceso de inoculación de embriones y cosecha de líquidos embrionarios en el gabinete de bioseguridad
3. Aplicar las normas de bioseguridad universal cuando manipule muestras clínicas o coseche líquidos embrionarios. Utilizar precauciones especiales si se sospecha de virus influenza de alta patogenicidad o nuevos subtipos virales.
4. Sustituir en lo posible el material de vidrio por material de plástico descartable y elimine el material contaminado en bolsas para autoclave.
5. Descontaminar inmediatamente los desechos líquidos conteniendo material infeccioso con hipoclorito de sodio o por autoclave..
6. Realizar la centrifugación utilizando soportes con tapa de seguridad. Abrir los tubos de centrifuga en el gabinete de bioseguridad.
7. Desinfectar las superficies de trabajo después de la finalizar el análisis o después de un derrame accidental.
8. Evite las contaminaciones cruzadas:
 - Nunca procese muestras clínicas y virus adaptado en el laboratorio al mismo tiempo
 - Nunca procese muestras clínicas humanas, de mamíferos o aves en el mismo laboratorio

Procedimiento

Inoculación de huevos

1. Examinar los huevos en el ovoscopio para verificar la viabilidad, localizar el embrión y marcar la cámara de aire. Descartar los huevos infértiles
2. Colocar los embriones en una bandeja y rotarlos con el número de la muestra (3 huevos por muestra)
3. Desinfectar los huevos con alcohol de 70% y abrir un pequeño orificio perforando la cáscara a nivel de la cámara de aire
4. Aspirar 0,8 ml de la muestra en la jeringa de tuberculina con la aguja calibre 22 1½ pulgada
5. Mantener el huevo cerca del ovoscopio para visualizar el embrión y la cavidad alantoidea, insertar la aguja por la perforación y dirigirla hacia la membrana amniótica e inocular 0,1 ml de la muestra en la cavidad amniótica. Retirar ligeramente la aguja e inocular 0,1ml en la cavidad alantoidea.
6. Inocular los otros dos huevos de la forma señalada anteriormente
7. Eliminar la jeringa y aguja en un recipiente descartable para material punzante.
8. Cerrar las perforaciones de la cáscara con goma
9. Incubar los huevos inoculados a 33-34°C por 2-3 días.

Cosecha de los líquidos amniótico y alantoideo

1. Colocar los huevos inoculados a 4°C durante toda la noche.
2. Rotular un tubo de 15 ml por cada huevo con el número de la muestra inoculada.
3. Desinfectar los huevos con alcohol de 70%
4. Romper y remover la cáscara del huevo en la cámara de aire usando pinzas estériles. Remover la membrana alantoidea.
5. Aspirar el líquido alantoideo usando una pipeta de 10 ml y transferirlo al tubo de 15 ml previamente rotulado.
6. Aspirar el líquido amniótico usando una jeringa y aguja y transferirlo a un tubo previamente rotulado. Debido a que el volumen de líquido amniótico es muy pequeño, se recomienda mezclar los líquidos de los 3 huevos inoculados con la misma muestra.
7. Centrifugar los líquidos cosechados a 3.000 rpm por 5 minutos para remover exceso de sangre o tejido
8. Evaluar el crecimiento viral usando la técnica de hemaglutinación (HA)

5. AISLAMIENTO DE VIRUS INFLUENZA EN CULTIVOS CELULARES

Introducción

Los cultivos celulares son utilizados en la mayoría de los laboratorios para el diagnóstico virológico por aislamiento e identificación viral. La línea celular de riñón de perro Madin-Derby (MDCK) esta reconocida por tener alta sensibilidad para los virus influenza humanos y de mamíferos.

Equipo

1. Gabinete de flujo laminar
2. Incubador de CO₂ a 37°C
3. Centrifuga refrigerada
4. Vortex
5. Equipo de protección personal: guantes, bata de laboratorio, mascararas

Materiales

1. Frascos de cultivo celular T-75
2. Frascos de cultivo de TC-25.
3. Tubos de cultivo celular
4. Pipetas serológicas de 1, 5 y 10 ml
5. Tubos de 10-15 ml
6. Viales de 2 ml
7. Filtros millipore 0,20 µm

Reactivos

1. Cultivos celulares MDCK. American type culture Collection. Cat. # ATCC CCL 34
 - a. Monocapa confluyente de células MDCK en frascos TC-75
 - b. Monocapa confluyente de de células MDCK en frascos TC-25
2. Medio Eagle de Dulbeco modificado (D-MEM) Gibco. Cat. # 11965-092
3. Solución madre de penicilina-estreptomicina (penicilina G 10.000 U/ml, sulfato de estreptomicina 10.000 µg/ml) Gibco BRL Cat. # 15140-023
4. Suero fetal bovino. Laboratorios Hyclone Inc. Cat. # A-1111-L
5. Sero albumina bovina fraccion V Gibco BRL Cat. # 15260-011
6. Tripsina EDTA (tripsina 0,05%, 0,53 nM EDTA.4Na. Gibco Cat. # 25300-054
7. Tripsina TPCK tratada. (tipo XIII de páncreas de bovino)
8. Tampón HEPES 1M Gibco BRL Cat # 15630-023
9. Especímenes clínicos

I. Preparación de medios y otros reactivos:

1. Medio D-MEM con L- Glutamina suplementado:

A 500 ml de D-MEM añadir:	
Solución madre de antibióticos	5ml (concentración final 100 U/ml de penicilina G y 100 µg/ml de sulfato de estreptomicina)
Sero albúmina bovina	12,5 ml (concentración final 0,2%)
Tampón HEPES	12,5 ml (concentración final 0,2%)

Para el medio de crecimiento celular, añada 10ml de suero fetal bovino (SFB) a 90 ml de D-MEM suplementado

Para el medio de crecimiento viral, añada 0,5 ml de Tripsina TPCK (de una solución madre conteniendo 2mg/ml) a 500 ml de D-MEM suplementado sin suero (concentración final 2 µg/ml)

Solución madre de Tripsina TPCK

- Disolver 20 mg de Tripsina TPCK en 10 ml de agua desmineralizada
- Esterilizar por filtración (millipore de 0,2 µm)
- Distribuya en volúmenes de 0.5 ml y almacene a -20°C

II. Preparación de cultivos celulares en frascos TC-25

Utilizando un frasco de cultivo celular TC-75 con monocapa confluyente de células MDCK, preparar los frascos de cultivo celular TC-25 de la siguiente manera:

1. Eliminar el medio de cultivo y añadir 5 ml de tripsina-EDTA precalentada a 37°C
2. Distribuir la tripsina-EDTA en toda la monocapa celular moviendo el frasco suavemente por 1 minuto. Remover la tripsina usando una pipeta estéril
3. Añadir 1ml de tripsina EDTA y distribuirla en toda la monocapa. Incubar a 37°C hasta que la monocapa de células se desprenda de la superficie (5-10 minutos)
4. Añadir 1 ml de suero fetal bovino para inactivar la tripsina-EDTA.
5. Añadir 8 ml de D-MEM suplementado y 10% de SFB. Pipetear suavemente para resuspender los agregados celulares
6. Transferir los 10ml de la suspensión de células a un frasco conteniendo 90 ml de D-MEM suplementado y 10% de SFB. Esta suspensión celular debe contener aproximadamente 150 células/ml
7. Transferir 6 ml de la suspensión celular a los frascos de cultivo TC-25 y conservar el remanente en frascos TC-75 para el pasaje celular.

8. Incubar los frascos a 37°C

Observación: los cultivos de células MDCK pueden perder sensibilidad con el pasaje continuo, por lo tanto el laboratorio debe mantener en nitrógeno líquido un stock de células con bajo pasaje. Se recomienda:

- Descongelar nuevas células cada 15-20 pasajes para mantener la sensibilidad en el diagnóstico.
- Evaluar periódicamente la sensibilidad usando un control positivo de título conocido
- Evaluar periódicamente la contaminación por micoplasma.

III. Inoculación de cultivos celulares con muestras clínicas

Recomendaciones de bioseguridad

1. Utilizar equipo de protección personal: guantes, bata, máscara y guantes
2. Realizar todo el proceso de inoculación de las muestras en el gabinete de bioseguridad ya que se pueden crear aerosoles conteniendo patógenos del tracto respiratorio
3. Aplicar las normas de bioseguridad universal cuando manipule muestras clínicas y utilizar precauciones especiales si se sospecha de virus influenza de alta patogenicidad o nuevos subtipos virales.
4. Sustituir en lo posible el material de vidrio por material de plástico descartable y elimine el material contaminado en bolsas para autoclave.
5. Descontaminar inmediatamente los desechos líquidos conteniendo material infeccioso con hipoclorito de sodio o por autoclave..
6. Desinfectar las superficies de trabajo después de la finalizar el análisis o después de un derrame accidental.
7. Evite las contaminaciones cruzadas:
 - Nunca procese muestras clínicas y virus adaptado en el laboratorio al mismo tiempo
 - Nunca procese muestras clínicas humanas, de mamíferos o aves en el mismo laboratorio

Procedimiento

1. Evaluar la monocapa celular en el microscopio a la magnificación de 40X
2. Decantar el medio de crecimiento en un recipiente con desinfectante y lavar la monocapa celular tres veces usando 6 ml de D-MEM suplementado conteniendo 2 µg/ml de Tripsina TCPK
3. Inocular 200 µl de cada espécimen en un frasco de cultivo de células usando puntas de pipeta estériles

4. Dejar adsorber el inóculo por 30 minutos a 37°C
5. Añadir 6 ml de D-MEM suplementado conteniendo 2 µg/ml de Tripsina TCPK
6. Incubar a 33° en incubador de CO₂.
7. Observar el efecto citopático (ECP) diariamente
8. Cosechar los cultivos que presenten 3+ o 4+ de ECP. Cosechar todos los cultivos el día 6 o 7 si no hay ECP. Colectar el sobrenadante y añadir sero albúmina bovina a la concentración final de 0,5%.
9. Evaluar el crecimiento viral usando la técnica de hemaglutinación (HA) como se describe mas adelante. Si la HA es negativa, realizar hasta 2 pasajes antes de reportar como negativo. Si es positivo realizar la identificación del tipo y subtipo viral por la técnica de IHA o RT-PCR.

6. IDENTIFICACIÓN DE VIRUS INFLUENZA POR LA TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IHA)

Una de las glicoproteínas superficiales del virus influenza denominada HA tiene la propiedad de aglutinar glóbulos rojos de algunas especies de animales, por lo que esta propiedad de hemaglutinación es utilizada para la detección de crecimiento viral en huevos embrionados y cultivos celulares. La interferencia en la unión de la HA a los receptores presentes en la superficie de los glóbulos rojos por anticuerpos específicos para la HA constituye el principio de la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA).

La técnica de IHA es altamente específica y sensible, pero se requiere disponer de antisueros específicos para los 16 subtipos de HA del virus influenza los cual deben ser tratados previamente para eliminar inhibidores inespecíficos y debe estandarizarse la cantidad de antígeno en cada reacción.

Equipo

1. Baño de maría a 33°C
2. Baño de maría a 56°C
3. Centrífuga

Reactivos

1. Enzima destructora de receptores (RDE) de *Vibrio cólera*
2. Antisueros de referencia para las HA. Se recomienda disponer como mínimo de los siguientes antisueros

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">a. H1a ... A/PR/8/34 (H1N1)b. H1b... A/FM/1/47(H1N1)c. H1c... A/swine/1A/30 (H1N1)d. H1d... A/swine/ 2009 (H1N1) Pandémicae. H3a.... A/Hong Kong/68 (H3N2)f. H3b... A/equine/Miami/63 H3N2)g. H3c... A/duck/Ukraine/63 (H3N2)h. H5 ... A/tern/so.Af/61 (H5N3)i. H7aA/equine/Prague/56/ (H7N7)j. H7b.... A/FPV/Rostock/34 (H7N1). |
|--|

3. Glóbulos rojos (pollo, pavo, cobayo, humanos grupo O) en solución de Alsever's
4. Agua destilada estéril
5. Solución buffer fosfato salino (PBS) 0,01M pH 7.2

a. Preparar una solución madre buffer fosfato 25X	A 75 ml de H ₂ O desmineralizada añadir y disolver cada uno de los siguientes químicos:
	i. Fosfato de sodio dibasico (Na ₂ HPO ₄) 2,74 g
	ii. Fosfato de sodio monobasico (NaH ₂ PO ₄ X H ₂ O)..... 0,79 g
	iii. H ₂ O desmineralizada 100 ml

b. Preparación de PBS 1X	A 800 ml H ₂ O desmineralizada añadir:
	i. Cloruro de sodio (NaCl).....8,9 g. Agitar hasta disolver
	ii. Solución madre buffer fosfato 25X40 ml. agitar
	iii. H ₂ O desmineralizada hasta 1000 ml
	iv. Ajustar el pH si es necesario con 1N NaOH o 1N HCL

6. Solución de Alsever's

a. A 900 ml de H ₂ O destilada los siguientes componentes químicos disolviendo bien cada uno:	A 800 ml H ₂ O desmineralizada añadir:
	i. Dextrosa.....20,5gr agitar hasta disolver
	ii. Citrato de sodio (Na ₃ C ₆ H ₅ O ₇ 2H ₂ O)... 8,0 gr agitar hasta disolver
	iii. Cloruro de sodio (NaCl)4,2 gr agitar hasta disolver
	iv. Citrato acido (C ₆ H ₈ O ₇)0,55 gr. agitar hasta disolver
	v. Añadir H ₂ O desmineralizada hasta completar 1000 ml y agitar
	vi. Ajustar el pH a 6,1 ± 0,1 con 1N NaOH o 1N HCL
	vii. Esterilizar por filtración y almacenar a 4°C

7. Solución salina fisiológica (NaCl) 0,85%

<p>a. Solución madre 20 X:</p>	<p>i. Cloruro de sodio (NaCl)..... 170 gr</p> <p>ii. H2O desmineralizada900 ml agitar hasta disolver</p> <p>iii. Añadir H2O desmineralizada agua hasta completar 1000 y agitar</p> <p>iv. Esterilizar en autoclave a 121°C y almacenar 4°C</p>
<p>b. Solución de trabajo 1X:</p>	<p>i. Solución madre 20 X.....50 ml</p> <p>ii. H2O desmineralizada950 ml</p>

Materiales

1. Pipetas serológicas y pro-pipetas
2. Pipetas ajustables de 10-200, 200-1000µl)
3. Pipeta multicanal)
4. Puntas universales
5. Gradillas y tubos
6. Microplacas de 96 cavidades en fondo en “V” para glóbulos rojos de pollo y pavo o en “U” para glóbulos rojos humanos y cobayo
7. Tubos de centrifuga de 50 ml
8. Toallas absorbentes

Recomendaciones de bioseguridad

1. Utilizar equipo de protección personal: guantes, bata, mascara y guantes
2. Realizar todo el proceso de análisis de líquidos embrionarios en el gabinete de bioseguridad ya que se pueden crear aerosoles conteniendo patógenos del tracto respiratorio
3. Aplicar las normas de bioseguridad universal cuando manipule productos de cultivo viral y utilizar precauciones especiales si se sospecha de virus influenza de alta patogenicidad o nuevos subtipos virales.
4. Sustituir en lo posible el material de vidrio por material de plástico descartable y elimine el material contaminado en bolsas para autoclave.
5. Descontaminar inmediatamente los desechos líquidos conteniendo material infeccioso con hipoclorito de sodio o por autoclave..

6. Desinfectar las superficies de trabajo después de la finalizar el análisis o después de un derrame accidental.
7. Evite las contaminaciones cruzadas:
 - Nunca procese muestras clínicas y virus adaptado en el laboratorio al mismo tiempo
 - Nunca procese muestras clínicas humanas, de mamíferos o aves en el mismo laboratorio

Procedimiento

I. Lavado y estandarización de glóbulos rojos:

1. Filtrar el 5-10 ml de la suspensión de glóbulos rojos en Alsever's usando una gasa estéril colectándola en un tubo de centrifuga de 50ml
2. Centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos
3. Aspirar el sobrenadante removiendo cuidadosamente la capa de glóbulos blancos
4. Añadir 50 ml de PBS pH 7.2) y mezclar suavemente hasta suspender el paquete celular
5. Centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos. Aspirar el sobrenadante
6. Repetir el lavado con PBS (pH 7.2) 2 veces
7. Resuspender el paquete celular en 12ml de PBS (pH 7.2) , transferir la suspensión a un tubo de centrifuga de 15 ml
8. Centrifugar a 1.500 rpm por 10 minutos
9. Estimar el volumen del paquete celular y remueva el sobrenadante cuidadosamente
10. Multiplique el volumen del paquete celular por 24, este valor dará el volumen de PBS (pH 7.2) necesario para preparar una suspensión de glóbulos rojos al 4%
11. La suspensión de glóbulos rojos al 4% es usada para preparar la suspensión al 0,5% de glóbulos rojos de pollo o suspensión de glóbulos rojos al 0,75% de glóbulos rojos de cobayo o humanos grupo O.

II. Ajuste de la concentración de la suspensión de glóbulos rojos usando el hemocitometro:

1. Preparar una dilución 1:100 de suspensión de glóbulos rojos al 4% añadiendo 0,5 ml de la suspensión a 49,5 ml de PBS (pH 7.2)
2. Colocar 10 µl de la suspensión en el canal del hemocitometro y dejar dispersar la suspensión
3. Cuente el número de células presentes en los 4 cuadrados de las esquinas de la unidad
4. Calcule el volumen final de la suspensión usando la siguiente formula:
 - a. Vol. final 0,5% = $\frac{\# \text{ de células}}{160} \times \text{volumen inicial de la suspensión de glóbulos rojos de pollo}$

160

O

- b. Vol. final 0,75% = $\frac{\# \text{ de células}}{240}$ X volumen inicial de la suspensión de glóbulos rojos de cobayo o humano

III. Tratamiento de sueros de referencia para eliminación de inhibidores inespecíficos

Los sueros contra subtipos de virus influenza producidos en animales contienen inhibidores inespecíficos que son removidos mediante el tratamiento con RDE.

1. Reconstituir el antisuero de referencia según el volumen indicado en el rotulo utilizando H₂O desmineralizada estéril. Almacenar a -20°C
2. Reconstituir el RDE en 25 ml de solución salina 0,85%. Distribuir en volúmenes de 1ml. Almacenar a -20°C
3. Añadir 3 volúmenes de RDE por 1 volumen de suero (0,9 ml RDE+0,1ml de suero)
4. Incubar a 37°C durante toda la noche
5. Incubar a 56°C por 30 minutos para inactivar la RDE
6. Dejar enfriar el suero a temperatura ambiente y añadir 6 volúmenes de solución salina 0,85%.para hacer una dilución 1:10

IV. Identificación de aglutininas inespecíficas presentes en el suero de referencia.

1. Rotular una microplaca de 96 cavidades utilizando una columna A-H con los sueros de referencia
2. Distribuir 50 µl de PBS (pH 7,2) en los pozos de la última columna A12-H12 para control de glóbulos rojos
3. Distribuir 25 µl de PBS (pH 7,2) en el resto de la placa exceptuando la primera columna A1-H1.
4. Añadir 50 µl de de la dilución del suero de referencia (1:10) en los pozos de la primera columna A1-H1
5. Preparar diluciones seriadas transfiriendo 25 µl desde los pozos de la primera columna a los pozos sucesivos hasta la columna 11. Descartar los últimos 25 µl
6. Añadir 50 µl de suspensión de glóbulos rojos a todos los pozos de la placa
7. Mezclar e incubar a temperatura ambiente por 20-30 minutos si se usa suspensión de glóbulos rojos de pollo o pavo o por 60 minutos para las suspensiones de glóbulos rojos de cobayo o humano

Interpretación: Si los glóbulos rojos sedimentan el suero es aceptable para la prueba de IHA. La presencia de aglutininas se evidencia cuando los lóbulos rojos no sedimentan en cuyo caso deben adsorberse las aglutininas.

V. Absorción de aglutininas de los antisueros de referencia

1. Añadir 1 volumen de un paquete de glóbulos rojos a 20 volúmenes de antisuero de referencia tratado con RDE.
2. Mezclar e incubar a 4°C por 1 hora mezclando a intervalos de 15 minutos para suspender los glóbulos rojos
3. Centrifugar a 1.200 rpm por 10 minutos
4. Remover cuidadosamente el sobrenadante y transfíeralo a un vial estéril
5. Repetir el paso IV para identificar la ausencia de aglutininas.
6. Repetir la absorción con glóbulos rojos hasta la remoción total de aglutininas.

VI. Titulación de los antígenos de referencia y virus aislados por la técnica de hemaglutinación (HA).

1. Seleccionar microplacas en "V" para la IHA con glóbulos rojos de pollo o pavo y microplacas en "U" para la HA con glóbulos rojos de cobayo o humanos grupo O
2. Rotular la placa con los antígenos control y virus aislados a ser titulados
3. Añadir 50 µl de PBS (pH 7,2) en los pozos de la placa excepto la primera columna
4. Añadir 100 µl de antígeno control y virus aislados en los pozos de la columna A1-G1. Dejar los pozos de la línea H1-H12 para control de glóbulos rojos
5. Diluir en forma seriada transfiriendo 50 µl de antígeno control y virus aislados de la primera columna a los pozos siguientes y descarte los últimos 50 µl.
6. Añadir 50 µl de glóbulos rojos a todos los pozos de la placa y mezclar bien
7. Incubar a temperatura ambiente por 20-30 minutos si se usa suspensión de glóbulos rojos de pollo o pavo o por 60 minutos para las suspensiones de glóbulos rojos de cobayo o humano

La hemaglutinación ocurre cuando los glóbulos rojos permanecen en suspensión después que los controles han sedimentado completamente, esta observación es registrada como "+". Cuando ocurre sedimentación parcial se registra como "+/-". Si hay ausencia de aglutinación los glóbulos rojos sedimentan formando un botón compacto semejante al botón formado por en los controles de glóbulos rojos y en este caso se registra "-". Los glóbulos rojos de cobayo y humanos tienden a formar un halo y para verificar la aglutinación se puede inclinar la microplaca y observar la velocidad del flujo de los glóbulos rojos en los controles de glóbulos rojos en relación al observado con los antígenos y virus aislados.

La mayor dilución de antígeno en la que se observe aglutinación completa de glóbulos rojos es considerada el título hemaglutinante de los antígenos de referencia y los aislados de virus.

VII. Preparación de la solución de antígenos y virus aislados y su re-titulación

La técnica de inhibición de hemaglutinación (IHA) utiliza 4 unidades hemaglutinantes (UHA) hemaglutinantes/dilución de suero de referencia. Se define como unidad aglutinante la cantidad de antígeno o virus necesaria para aglutinar un volumen igual de glóbulos rojos.

1. Determinar el volumen de antígeno de referencia y virus aislados que es necesario para realizar la prueba de IHA, por ejemplo: 1 ml de antígeno se necesita para las diluciones de 5 sueros en 8 cavidades y a cada cavidad se añaden 25 µl de antígeno por lo tanto 5 sueros x 8 cavidades x 25 µl de antígeno o virus aislado = 1ml. Prepare 1 ml adicional para la re-titulación.
2. Debido a que se necesitan 4 UHA/25 µl o 8 UHA/50 µl de antígeno o virus aislado, calcular la dilución dividiendo el título HA por 8 por ejemplo si el título HA del antígeno o virus aislado es 160, la 8 UHA/50µl estarán contenidas en la dilución 1:20 del antígeno o virus aislado. Las proporciones serán: 1 parte de antígeno o virus aislado y 19 partes de PBS (pH 7,2)
3. Preparar la dilución de antígenos de referencia y virus aislados conteniendo 8 UHA/50 µl en el volumen requerido para la prueba de IHA
4. Realizar la re-titulación siguiendo el procedimiento descrito en el paso IV

Interpretación: La dilución del antígeno control y virus aislados contiene 4 UHA/25 µl o 8 UHA/50 si se observa HA en los primeros 4 pozos de la reacción de re-titulación. Si no contiene las UHA la dilución debe ajustarse añadiendo antígeno o virus aislado para aumentar o diluyendo para reducir las UHA. Ejemplo: si el título es 16 UHA el antígeno control o virus aislado debe diluirse el doble, si por el contrario el título es 3UHA quiere decir que la dilución solo tiene 4UHA/50 µl por lo que debe añadirse otro volumen de antígeno o virus aislado para ajustar la 8UHA/50 µl. Repetir la re-titulación como se indicó anteriormente para confirmar la presencia de las UHA deseadas.

VII. Prueba de Inhibición de la hemaglutinación (IHA) para la identificación de virus aislados.

Cada virus aislado debe confrontarse con diluciones seriadas de los antisueros de referencia

1. Rotular las microplacas considerando la reacción de cada uno de los antisueros de referencia con cada uno de y los antígenos control y virus aislados.
2. Añadir 25 µl de PBS (pH 7,2) en todos los pozos de la placa excepto en la primera línea (A1-A11)
3. Añadir 50 µl de PBS (pH 7,2) en los posos de la columna 12 (A12-H12) para control de glóbulos rojos

4. Añadir 50 µl de cada antisuero de referencia tratado con RDE en los pozos correspondientes de la primera fila (A1-A11)
5. Preparar diluciones seriadas en base 1:2 transfiriendo 25 µl de antisuero desde la primera fila a los pozos siguientes. Descarte los últimos 25 µl de la línea H1-H12
6. Añadir 25 µl de antígeno o virus aislado conteniendo 4UHA/ µl a cada una de las diluciones de los antisueros de referencia.
7. Mezclar bien e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)
8. Añadir 50 µl de suspensión estandarizada de glóbulos rojos y mezclar bien.
9. Incubar por 15-30 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)
10. Registre el titulo IHA

Interpretación: Si ocurre reacción antígeno/anticuerpo la hemaglutinación de los glóbulos rojos es inhibida. Utilizar los símbolos “+” para HA, “+/-” parcial y “-” para IHA. El titulo es la dilución más alta del antisuero de referencia que inhibe totalmente la hemaglutinación.

Se identifica el tipo y subtipo de virus influenza si el virus aislado reacciona con uno de los antisueros de referencia mostrando un titulo IHA \geq a 4 diluciones que con los otros antisueros.

7. IDENTIFICACIÓN DE LOS VIRUS INFLUENZA A POR LAS TÉCNICA DE AMPLIFICACIÓN GENÉTICA PARCIAL POR LA ENZIMA POLIMERASA (RT-CPR)

Las técnicas de amplificación genómica parcial por la enzima polimerasa (PCR) convencional o en tiempo real rt-PCR son técnicas poderosas que esta disponible en un numero creciente de laboratorios que puede utilizarse para la identificación rápida de una gran variedad de patógenos. Debido a que el genoma de los virus influenza es tipo ARN de polaridad negativa, se debe sintetizar un ADN complementario (ADNc) antes de la reacción de amplificación usando la enzima transcriptasa reversa (RT). La amplificación logarítmica de un segmento de DNA ocurre en una reacción térmica cíclica (25-30 ciclos) a 92°C para desnaturalización del ADN, 42° para el anillaje de los partidores a la secuencia complementaria en el templete y 72°C para la síntesis y extensión de la cadena de ADN por la enzima polimerasa. Los componente de la reacción incluyen: el template ADN, promotores (primers) de oligonucleótidos (18-30 nucleótidos) delanteros y reversos, deoxinucleótidos (dNTPs: A, C, G, T) y Taq polimerasa ADN.

La detección del producto de la amplificación se puede realizar al final de la reacción de amplificación mediante electroforesis en gel de agarosa o en tiempo real (rt RT-PCR) en el cual el amplicon puede visualizarse según progresa la reacción utilizando oligonucleótidos marcados (sondas) con moléculas fluorescentes.

Debido a que las secuencias genéticas difieren entre tipos/subtipos de los virus influenza, solo es posible diseñar los partidores y sondas que pueden detectar específicamente el tipo o el subtipo de virus. El gen de la matrix (M) es el menos variable de todos los genes, por lo que puede ser utilizado para la detección de todos los virus influenza A, mientras que los genes de la H y N son utilizados para la identificación de subtipo y variantes que están circulando en la población.

I. Extracción del ácido nucleico usando el estuche Mini Qiagen QIAamp Viral RNA

Las estructuras celulares y proteínas presentes en muestra son lisadas usando un agente desnaturizante (buffer de lisis) con la inactivación simultánea por RNAsas, con lo cual el ARN viral es liberado a la solución. El ARN se une a la membrana QIAamp con la asistencia del ARN de transferencia (carrier) y los contaminantes: proteínas e inhibidores de nucleasas son eliminados durante el lavado con los tampones de lavado. El ARN purificado es eluido de la membrana usando un buffer de elución

El Mini. Qiagen QIAamp Viral RNA es usado para la extracción de ARN viral de suero, plasma, cultivo celular, aspirado o hisopado respiratorio.

Reactivos

1. Tampón Lisis AVL (Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit., Cat. # 52904 / Cat. #52906)
2. Etanol (96-100%), Molecular Biology Grade, Sigma Cat.# E7023
3. Tampón lavado AW1 (Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit., Cat. # 52904 / Cat. #52906)
4. Tampón lavado AW2 (Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit., Cat. # 52904 / Cat. #52906)
5. Tampón elución AVE (Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit., Cat. # 52904 / Cat. #52906)
6. Control positivo – cultivo de Virus
7. Control Negativo – Agua estéril (Sigma Cat.# W4502)

Preparación de reactivos

1. Tampón de lisis.

Trabajar en el área de extracción de ácidos nucleicos

- a. Verificar si el buffer de lisis AVL tiene precipitado. Si observa precipitado, incube el buffer a 80°C hasta que el precipitado se disuelva.
- b. Añadir 1 ml de buffer de lisis al tubo que contiene el ARN de transferencia (carrier), mezclar hasta disolver.
- c. Transferir el contenido al frasco de tampón de lisis y mezcle bien
- d. Registrar la fecha de preparación y almacene a 4°C

El tampón de lisis AVL es estable hasta por 6 meses almacenado a 4°C

2. Tampón de lavado AW 1

- a. Añadir 25 ml de etanol (95-100%) al buffer de lavado AW1 y mezcle bien.
- b. Rotular el frasco indicando que el alcohol fue añadido y registre la fecha de preparación
- c. Almacenar a temperatura ambiente

El buffer de lavado AW 1 es estable hasta por 1 año

3. Tampón de lavado AW 2

- a. Añadir 30 ml de etanol (90-100%) al tampón de lavado AW2 y mezcle bien
- d. Rotular el frasco indicando que el alcohol fue añadido y registre la fecha de preparación
- e. Almacenar a temperatura ambiente

El buffer de lavado AW2 es estable hasta por 1 año

Recomendaciones

- Todo el proceso de extracción de ácidos nucleicos debe realizarse en la cabina de bioseguridad
- Las soluciones tienen ácido de sodio como preservativo altamente tóxico y puede causar explosión al contacto con plomo o cobre.
- Usar guantes de látex durante todo el proceso de extracción de ácidos nucleicos.
- Descarte los tubos y puntas en una bolsa para autoclave
- El material contaminado con la muestra clínica debe descartarse en un recipiente con desinfectante.

Equipo

1. Mezclador Vortex
2. Microcentrífuga
3. Reloj
4. Pipetas ajustable de 20-200 µl
5. Pipeta ajustable de 200- 1000 µl
6. Gabinete de bioseguridad

Materiales

1. Tubos de microcentrífuga de 1,5 ml libres de ARNasas/ADNasas
2. Tubos de microcentrífuga de 0,5 ml libres de ARNasas/ADNasas
3. Puntas de pipetas 20 µl con filtro libre de ARNasas/ADNasas
4. Puntas de pipetas 200 µl con filtro libre de ARNasas/ADNasas
5. Puntas de pipetas 1000 µl con filtro libre de ARNasas/ADNasas
6. Columnas (Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit.)
7. Tubos colección (Qiagen QIAamp Viral RNA Mini Kit.)
8. Recipiente con desinfectante
9. Bolsas de autoclave

Procedimiento

1. Rotular 2 tubos de microcentrifuga de 1,5 ml por cada muestra clínica. Rotular 2 tubos de microcentrifuga de 1,5 ml para cada control (uno positivo y uno negativo) y separarlo en dos gradillas.
2. Colocar en una gradilla 3 tubos de colección por cada muestra y control
4. Rotular una columna por cada muestra y cada control y colocarlos en la primera columna con tubos de colección
5. Añadir 560 µl de tampón de lisis AVL un tubo de microcentrifuga de 1,5 ml por cada muestra y controles y cerrar cada tubo para evitar contaminación cruzada
6. Añadir 140 µl de la muestra y controles en los tubos correspondiente. Cerrar cada tubo antes de moverse al tubo siguiente. Añadir los controles después de las muestras
7. Mezclar en el vortex por 15 segundos
8. Incubar a temperatura ambiente (15-25°C) por 10 minutos
9. Centrifugar los tubos por 10 segundos
10. Añadir 560 µl de etanol (95-100%) a cada tubo
11. Mezclar el vortex por 15 segundos
12. Centrifugar los tubos por 15 segundos
13. Transferir 630 µl del las muestras y controles ala columna correspondiente/tubo de colección
14. Centrifugar las columnas/tubo de colección a 8.000 rpm por 1 minuto
15. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección y descartar tubo de colección con el filtrado en la bolsa para autoclave
16. Repetir los pasos 13-15
17. Añadir 500 µl de tampón de lavado AW1 A cada columna
18. Centrifugar las columnas/tubo de colección a 8.000 rpm por 1 minuto
19. Transferir la columna a un nuevo tubo de colección y descartar tubo de colección con el filtrado en la bolsa para autoclave
20. Añadir 500 µl de tampón de lavado AW2 A cada columna
21. Centrifugar las columnas/tubo de colección a 13.000 rpm por 3 minutos
22. Transferir la columna al tubo de microcentrifuga correspondiente y descartar tubo de colección con el filtrado en la bolsa para autoclave
23. Cuidadosamente añadir 60 µl de tampón de elución AVE a cada columna aplicando el tampón directamente a la membrana de la columna evitando tocarla.
24. Incubar a temperatura ambiente por 1 minuto y centrifugar a 8.000 rpm por 1 minuto
25. Separar el ARN en volúmenes de 20 µl en tubos de microcentrifuga de 0,5 ml y almacenar a -20°C

II. RT RT-PCR PARA DETECCIÓN DE INFLUENZA A, H1N1 PANDÉMICA. PROTOCOLO DE LA OMS.

La detección cualitativa de virus influenza A, influenza A suina y H1 pandémica en especímenes del tracto respiratorio de humanos, cerdos y cultivos celulares utilizando RT-PCR en tiempo real (rt RT-PCR) fue diseñado por los Centros para el Control de Enfermedades (CDC) de los Estados Unidos y Centro Colaborador de la OMS. Este protocolo puede o no detectar algunas cepas suinas H1. Este protocolo de rt RT-PCR ha sido optimizada utilizando un panel específico de oligonucleótidos partidores y sondas de hidrólisis (Taqman), el estuche Invitrogen SuperScript™III Platinum® One-Step Quantitative en los siguientes sistemas de termocicladores de tiempo real:

- Applied Biosystems™(7000, 7300, 7500, etc.),
- BioRad (iQ™ o iQ5™)
- Stratagene QPCR instruments (MX4000 MX3000 o MX3005)

Especímenes aceptables

Lavado bronco-alveolar, aspirados o lavados traqueales, nasofaríngeos, oro-faríngeos, hisopados nasales, nasofaríngeos y oro-faríngeos. Los hisopados deben ser de poliéster o dacron con palillos de plástico o aluminio.

Serán rechazadas las muestras colectadas con hisopos de algodón y palillos de madera. También será motivo de rechazo las muestras que no han sido conservadas a 2-4°C o congeladas a -70°C

Equipo

1. Gabinete de bioseguridad
2. Microcentrífuga
3. Vortex
4. Termociclador en tiempo real con formato de 96 cavidades.

Reactivos

1. Estuche cuantitativo de RT-PCR de un paso con sondas de hidrólisis (e.g Taqman® kit Invitrogen SuperScript™III Platinum® One-Step).Quantitative Kit. (cat# 11732-020 or 11745-100).
3. Agua destilada grado molecular (Libre de RNase y DNase)
4. Oligonucleótidos partidores (primers) delantero y reverso (40µM)
5. Sondas marcadas (10µM)
6. Controles positivos

Partidores y Sondas	Secuencias 5'>3'	Concentración final
Infl A delantero	GAC CRA TCC TGT CAC CTC TGA C	40 µM
Infl A reverso	AGG GCA TTY TGG ACA AAK CGT CTA	40 µM
Infl A ¹ sonda	TGC AGT CCT CGC TCA CTG GGC ACG	10 µM
Infl AS delantero	GCA CGG TCA GCA CTT ATY CTR AG	40 µM
Infl AS reverso	GTG RGC TGG GTT TTC ATT TGG TC	40 µM
Infl A ² sonda	CYA CTG CAA GCC CA" T" ACA CAC AAG CAG GCA	10 µM
SH1 delantero	GTG CTA TAA ACA CCA GCC TYC CA	40 µM
SH1 reverso	CGG GAT ATT CCT TAA TCC TGT RGC	40 µM
SH1 ² sonda	CA GAA TAT ACA "T"CC RGT CAC AAT TGG ARA A	10 µM
RnasaP delantero	AGA TTT GGA CCT GCG AGC G	40 µM
RnasaP reverso	GAG CGG CTG TCT CCA CAA GT	40 µM
RnasaP ¹ sonda	TTC TGA CCT GAA GGC TCT GCG CG	10 µM

- 1 Las sondas TaqMan® están marcadas en terminal 5'-con la molécula reportera 6-carboxyfluorescein (FAM) el quencher, Blackhole Quencher 1 (BHQ1) (Biosearch Technologies, Inc., Novato, CA) en el terminal 3'.
- 2 Las sondas TaqMan® están marcadas en terminal 5'-con la molécula reportera 6-carboxyfluorescein (FAM) y quencher interno modificado en el residuo T con BHQ1, con una modificación en el terminal 3' para prevenir la extensión con la Taq polimerasa.

Materiales

1. Marcador de laboratorio punta ultrafino
2. Gradillas refrigeradas para tubos de 1.5 ml, de 0,2ml para soportes de 96 cavidades para reacción de PCR
3. Pipetas ajustables de 1- 20µl, 20- 200µl y puntas con filtro
4. Tiras de tubos de 0,2ml para PCR
5. Tiras de tapas para tubos
6. Tubos de micro centrifuga de 1,5ml libres de nucleasas estériles
7. Guantes sin polvo

Procedimiento

Recomendaciones

1. Mantener áreas separadas para realizar la reacción el manejo de ácidos nucleicos.

2. Mantener equipos y materiales separados dedicados a las reacciones y manejo de ácidos nucleicos (pipetas microcentrífugas, puntas de pipeta, guantes batas de laboratorio).
3. Cambie de guantes entre muestra y cada vez que usted sospeche que estén contaminados.
4. Mantener tapados los tubos de las reacciones
5. Descontamine las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 5% o “DNAzap™” o “RNase AWAY®” para minimizar la contaminación de ácidos nucleicos

Preparación de reactivos

1. Descongele los partidores (primers) y las sondas mezclar y centrifugar brevemente y colocar en un bloque refrigerado
2. Colocar la mezcla maestra y enzima en un bloque refrigerado. Descongelar el vial de reacción 2X mezclar y centrifugar brevemente

Cada reacción de rt RT-PCR incluye:

1. ARN de las muestra es analizado con el siguiente grupo de iniciadores y sondas:
 - a. Influenza A,
 - b. Influenza A suina Universal,
 - c. H1 suino pandémico,
 - d. RNAsaP como control positivo interno para acido nucleico humano.
2. Control Negativo (sin templete) (CN) y control positivo (CP) para todo el grupo de iniciadores y sondas
3. Control negativo de muestras (CM) para validar el proceso de extracción y la integridad de los reactivos

Preparación de la reacción

1. Rotular un tubo de microcentrífuga de 1.5 para cada iniciador/sonda
2. Determinar el número de reacciones (N) en cada corrida incluyendo CN, CP y CM. Es necesario hacer un exceso de la mezcla considerando los errores de pipeteo
 - a. Si el numero $n = 14$ entonces $N = n + 1$
 - b. Si el numero es mas de 15 $N = n + 2$
3. Mezcla maestra de PCR: calcule la cantidad de cada reactivo que debe ser añadido para cada iniciador sonda de la siguiente forma:

Reactivo	Volumen
Agua libre de nucleasas	5,5 µl X N
Partidor delantero	0,5 µl X N
Partidor reverso	0,5 µl X N
Sonda	0,5 µl X N
SuperScript™ III RT/Platinum® Taq Mix	0,5 µl X N
Mezcla maestra de PCR 2X	12,5 µl X N
Volumen total	20ul µl X N

4. Después de añadir el agua, mezclar las mezcla maestras mediante pipeteo (no mezcle en el vortex)
5. Centrifugar 5 segundos para coleccionar el contenido en el fondo de tubo. Colocar el tubo en un bloque de refrigeración
6. Preparar una tira de reacciones o una placa de 96 tubos en un bloque de refrigeración
7. Dispensar 20 µl de cada mezcla en cada tubo de la reacción como se muestra a continuación:

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA
B	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs
C	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S
D	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP
M	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
E	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA	IA
F	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs	IAs
G	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S	IH1S
H	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP	RP

8. Añadir 5 µl de agua libre de nucleadas en los tubos de CN
9. Tapar todos los tubos de la reacción y llevarlos al área de extracción de ácidos nucleicos y colocarla en un bloque de refrigeración
10. Mezclar en el vortex por 5 segundos los tubos conteniendo el ARN de la muestras
11. Añadir 5 µl de cada muestra en los tubos rotulados de cada muestra como se indica a continuación:

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
B	CN	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
C	CN	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
D	CN	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
M	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
E	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	CE	CP
F	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	CE	CP
G	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	CE	CP
H	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	CE	CP

12. Tapar los tubos de cada columna después de añadir la muestra
13. Repetir los pasos 10-12 para todas las muestras
14. Añadir 5 µ del ARN control positivo
15. Centrifugar brevemente las tiras de tubos de la reacción y colocarla en el bloque de refrigeración

Condiciones de amplificación

El volumen de la reacción es 25 µl. Programar el termociclador de la forma siguiente:

Transcripción reversa	50°C 30 minutos
Inhibición de la Taq	92°C 2 segundos
Amplificación por PCR 45 ciclos	95°C 15 segundos 55°C 30 segundos

Interpretación

1. El CN no debe inhibir la fluorescencia por lo que no debe exhibir curvas a lo largo de la línea basal. Si esto ocurre con uno o mas partidores/sondas indica contaminación por lo tanto se invalida la reacción y debe repetirse.
2. Todas las muestras deben exhibir curvas de reacción RP a lo largo de la línea base o antes del ciclo 37 lo cual es indicativo de la presencia de suficiente ARN para el gene RNAasa humano indicando buena calidad del espécimen. Esta reacción puede o no puede estar presente en muestras de cerdos o muestras procedentes de cultivo celular o huevos embrionados
3. Las reacciones de control positivo para Infl. A, Infl. A Suino, H1 suino y RP deben exhibir curvas antes de los 40 ciclos. Si no ocurre se invalida la reacción y debe repetirse la reacción.
4. Si los controles cumplen con los requisitos se considera valida la reacción. Un espécimen es presuntivamente positivo para Influenza A/H1 si ambos Infl A y/o el respectivo subtipo H1 exhiben curvas por encima de la línea base dentro de los 40 ciclos
5. Cuando todos los controles cumplen con los requerimientos, un espécimen es considerado negativo si no exhibe curva por encima de la base en 40 ciclos.

III. RT-PCR PARA DETECCIÓN DE INFLUENZA A, H5 AVIAR Y H7 AVIAR DE ALTA PATOGENICIDAD. PROTOCOLO DE RECOMENDADO POR LA OIE

La detección cualitativa de virus influenza A, H5 y H7 de alta patogenicidad en especímenes del tracto respiratorio de humanos, aves domésticas y cultivos celulares utilizando RT-PCR en tiempo real (rt RT-PCR) fue diseñado por Spackman y Col. (2002). Ha sido optimizada utilizando un panel específico de oligonucleótidos partidores y sondas de hidrólisis y el estuche de QIAGEN OneStep RT-PCR Este protocolo puede o no detectar algunas cepas aviares H5 y H7 de alta patogenicidad americanas o H5 y H7 de baja patogenicidad

Equipo

1. Gabinete de bioseguridad
2. Microcentrífuga
3. Vortex
4. Termociclador en tiempo real con formato de 96 cavidades.

Reactivos

1. Qiagen one step (cat # 210210 o 210212).

Contenido del estuche:

- a. QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme (contains the QIAGEN products Omniscript Reverse Transcriptase, Sensiscript Reverse Transcriptase, and HotStarTaq DNA Polymerase)
 - b. QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer,* 5x
 - c. Q-Solution, 5x
 - d. dNTP Mix, 10 mM each
 - e. RNase-free water 1.9 ml 2 x 1.9 ml
 - f. Instrucciones ¹
2. Agua destilada grado molecular (Libre de RNase y DNase)
 3. Oligonucleótidos partidores (primers) delantero y reverso
 4. Sondas marcadas
 5. Controles positivos

Especificidad	Partidores y Sondas	Secuencias 5'>3'	Concentración final
Infl A	M+ 25 delantero	AGA TGA GTC TTC TAA CCG AGG TCG	10 µM
Inf A	M - 124 reverso	TGC AAA AAC ATC TTC AAG TCT CTG	10 µM
Infl A ¹	Sonda + 64	FAM-TCA GGC CCC CTC AAA GCC GA -TAMRA	0,3 µM
H5	H5+ 1456 delantero	ACG TAT GAC TAT CCA CAA TAC TCA G	10 µM
H5	H5 - 1685 reverso	AGA CCA GCT ACC ATG ATT GC	10 µM
H5 ¹	Sonda H5+1637	FAM- TCA ACA GTG GCG AGT TCC CTA GCA-TAMRA	0,3 µM
H7	H7 + 1244 delantero	ATT GGA ACA GAG ACG CAA TG	10 µM
H7	H7 – 1342 reverso	TTC TGA GTC CGC AAG ATC TAT TG	10 µM
H7	Sonda H7 1281	FRM-TAA TGC TGA GCT GTT GGT GGCA-TAMRA	0,3 µM

¹ Las sondas TaqMan® están marcadas en terminal 5'-con la molécula reportera 6-carboxyfluorescein (FAM) y el quencher carboxymetilrodamina (TAMRA) en el terminal 3'

Materiales

1. Marcador de laboratorio punta ultrafino
2. Gradillas refrigeradas para tubos de 1.5 ml, de 0,2ml para soportes de 96 cavidades para reacción de PCR
3. Pipetas ajustables de 1-20 µl, 20- 200µl y puntas con filtro
4. Tiras de tubos de 0,2ml para PCR
5. Tiras de tapas para tubos
6. Tubos de micro centrifuga de 1,5ml libres de nucleasas estériles
7. Guantes sin polvo

Recomendaciones de seguridad

1. Mantener áreas separadas para realizar la reacción el manejo de ácidos nucleicos.
2. Mantener equipos y materiales separados dedicados a las reacciones y manejo de ácidos nucleicos (pipetas microcentrifugas, puntas, guantes batas de laboratorio).
3. Cambie de guantes entre muestra y cada vez que usted sospeche que estén contaminados.
4. Mantener tapados los tubos de las reacciones
5. Descontamine las superficies de trabajo con hipoclorito de sodio al 5% o “DNAzap™” or “RNase AWAY®” para minimizar la contaminación de ácidos nucleicos

Procedimiento

Preparación de reactivos

1. Descongele los partidores y las sondas mezclar y centrifugar brevemente y colocar en un bloque refrigerado
2. Colocar la mezcla maestra y enzima en un bloque refrigerado. Descongelar el vial de reacción 2X mezclar y centrifugar brevemente

Cada reacción de rt RT-PCR incluye:

1. ARN de las muestra es analizado con el siguiente grupo de partidores y sondas:
 - a. Influenza A,
 - b. Hemaglutinina H5 asiática alta patogenicidad
 - c. Hemaglutinina H7 alta patogenicidad
2. Control Negativo (sin template) (CN) y control positivo (CP) para todo el grupo de iniciadores y sondas
3. Un control negativo de muestras (CM) para validar el proceso de extracción y la integridad de los reactivos

Preparación de la reacción

1. Rotular un tubo de microcentrífuga de 1.5 para cada partidador/sonda
2. Determinar el número de reacciones (N) en cada corrida incluyendo CN, CP y CM. Es necesario hacer un exceso de la mezcla considerando los errores de pipeteo
 - a. Si el numero $n = 14$ entonces $N = n + 1$
 - b. Si el numero es mas de 15 $N = n + 2$
3. Mezcla maestra de PCR: calcule la cantidad de cada reactivo que debe ser añadido para cada partidador/sonda de la siguiente forma:

Reactivo	Volumen	Concentración final
Agua libre de nucleasas	5,75 μ l X N	
Tampón 5X	5 μ l X N	1X
MgCl ₂	1,25 X N	3,75 mM/25 μ l
dNTP's (10mM c/u)	1 μ l X N	400 μ M c/dNTP/25 μ l
Inhibidor de RNasa (13,3 U/ μ l)	0,5 μ l X N	6,6 U/25 μ l
Partidor delantero	0,5 μ l X N	10 μ M /25 μ l
Partidor reverso	0,5 μ l X N	10 μ M I/25 μ l
Sonda	0,5 μ l X N	0,3 μ M/25 μ l
Enzimas	2,0 μ l X N	-
Volumen total	17 μ l μ l X N	

4. Después de añadir el agua, mezclar las mezcla maestras mediante pipeteando (no mezcle en el vortex)
5. Centrifugar 5 segundos para colectar el contenido en el fondo de tubo. Colocar el tubo en un bloque de refrigeración
6. Preparar una tira de reacciones o una placa de 96 tubos en un bloque de refrigeración
7. Dispensar 20 µl de cada mezcla en cada tubo de la reacción como se muestra a continuación:

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A
B	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5
C	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7
M	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
E	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A	I A
F	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5	H5
G	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7	H7

8. Añadir 8 µl de agua libre de nucleadas en los tubos de CN
9. Tape todos los tubos de la reacción y llevarla al área de extracción de ácidos nucleicos y colocarla en un bloque de refrigeración
10. Mezcle en el vortex por 5 segundos los tubos conteniendo el ARN de la muestras
11. Añadir 8 µl de cada muestra en los tubos rotulados de cada muestra como se indica a continuación:

M	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	CN	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
B	CN	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
C	CN	M1	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11
M	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
E	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	CP
F	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	CP
G	M13	M14	M15	M16	M17	M18	M19	M20	M21	M22	M23	CP

12. Tapar los tubos de cada columna después de añadir la muestra
13. Repetir los 10-13 para todas las muestras
14. Añadir 8 µl del ARN control positivo

- Centrifugar brevemente las tiras de tubos de la reacción y colocarla en el bloque de refrigeración

Condiciones de amplificación

El volumen de la reacción es 25 µl. Programar el termociclador de la forma siguiente:

Transcripción reversa	50°C 30 minutos 94°C 15 minutos
Amplificación Infl A 45 ciclos	94°C 2 segundos 60 °C 20 segundos
Amplificación H5 40 ciclos	94°C 1 segundo 57°C 20 segundos 72°C 5 segundos
Amplificación H7 40 ciclos	94°C 2 segundos 58 °C 20 segundos

Interpretación

- El CN no debe inhibir la fluorescencia por lo que no debe exhibir curvas a lo largo de la línea basal. Si esto ocurre con uno o mas partidores/sondas indica contaminación por lo tanto se invalida la reacción y debe repetirse
- Las reacciones de control positivo para Infl. A, H5 y H7 deben exhibir curvas antes de los 40 ciclos. Si no ocurre se invalida la reacción y debe repetirse la reacción.
- Si los controles cumplen con los requisitos se considera valida la reacción. Un espécimen es presuntivamente positivo para Influenza A/H1 o influenza A/H7 si ambos infl. A y/o el respectivo subtipo H exhiben curvas por encima de la línea base dentro de los 40 ciclos
- Cuando todos los controles cumplen con los requerimientos, un espécimen es considerado negativo si no exhibe curva por encima de la base en 40 ciclos.

8. DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE VIRUS INFLUENZA

El diagnóstico serológico de influenza en mamíferos y aves debe realizarse en dos pasos a menos que se conozca los subtipos circulantes en el país. El primer paso sería la detección de anticuerpos para cualquier virus influenza subtipo A y el segundo paso es determinación de anticuerpos contra el subtipo de H del virus en las muestras positivas detectadas en el primer paso.

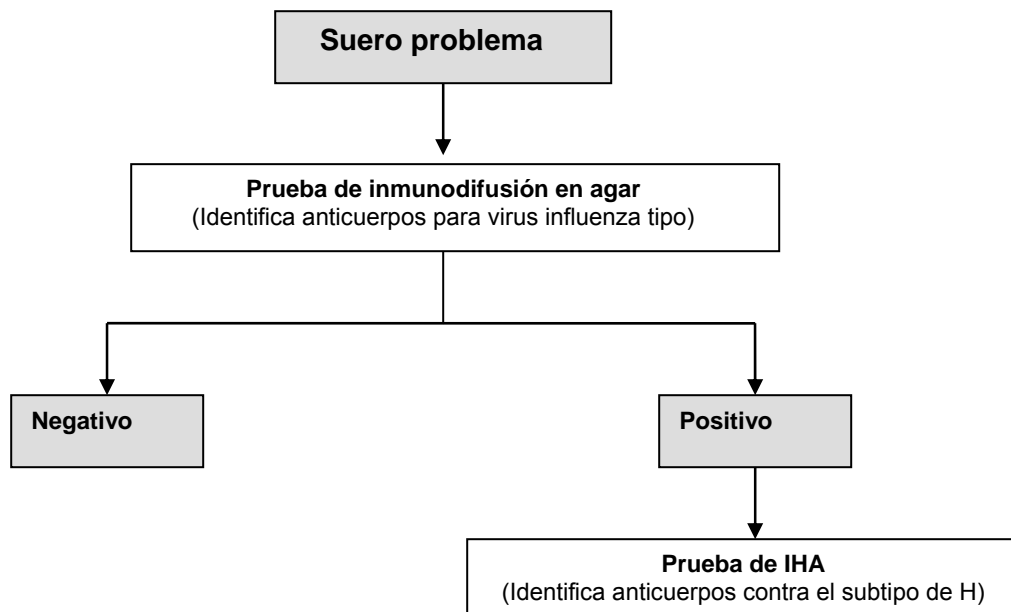
La detección de anticuerpos para cualquier virus influenza tipo A la reacción antígeno anticuerpo utiliza antígenos preparados de la proteína de Matrix (M) o la nucleoproteína (NP). La técnica inmunodifusión en agar (IDA) es la técnica mas ampliamente utilizada en la mayoría de los laboratorios veterinarios, es altamente específica y sencilla pero de sensibilidad limitada. La técnica inmuno enzimática (ELISA) es más sensible pero más compleja y requiere equipo de laboratorio. Varios estuches comerciales en formato indirecto o de captura están disponibles en el mercado pero su sensibilidad debe validarse para las distintas especies de animales.

La detección de anticuerpos contra el subtipo de H se realiza por la técnica de inhibición de la hemaglutinación para lo cual se debe disponer en el laboratorio de antígenos de referencia al menos de los siguientes virus

- Aviar: H5N1, H5N9, H7N7, H7N3,
- Suino H1N1 clásico, H3N2 y H1N1 pandémico

En caso de obtener muestras de suero positivas para las H antes mencionadas se debe determinar el tipo de N enviándola al los laboratorios de referencia de la OIE

Algoritmo para el diagnostico serológico



9. TÉCNICA DE INMUNODIFUSIÓN EN AGAR (IDA) UTILIZANDO EL ANTÍGENO DE LA NP PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS PARA INFLUENZA TIPO A

La técnica de IDA se basa en la migración del antígeno y el anticuerpo en un medio de agar. El medio tiene una alta concentración de sales de facilita la precipitación del complejo antígeno-anticuerpo. Como todos los virus influenza A tiene proteínas de la matrix (M) y la nucleoproteína (NP), similares estos antígenos son utilizados para determinación de anticuerpos para influenza A para lo cual deben prepararse antígenos concentrados preparados para uno o ambos antígenos.

Reactivos

1. Preparación de gel de agarosa al 1% o gel de agar al 8%:

a. Cloruro de sodio (NaCl)	80 gr.	Disolver el sodio y el fenol en agua destilada y ajustar el pH a 7,5 con NaOH 1N. Añadir la agarosa o el agar y disolver por calentamiento. Dispense en volúmenes de 20ml y deje solidificar a temperatura ambiente.
b. Fenol	5gr	
c. Agarosa (Sigma II) 10 gr. o Oxoid agar N° 112,5 gr.		
d. Agua destilada.....	1 lt	

2. Antígeno de Influenza A Aviar para la IDA.
3. Antígeno de Influenza A porcina para la IDA
4. Antisuero de influenza A para IDA
5. Suero control positivo.

Equipo y materiales

1. Lámpara o lupa
2. Molde: cortador de siete pocillos (uno central rodeado por 6 pocillos igualmente separados. Los pocillos tienen un diámetro de 5,3 mm y con una separación de 2,4 mm entre todos ellos).
3. Trampa de vacío
4. Mechero Bunsen
5. Placas de Petri o laminas de microscopio 2,3x 7,3 cm.
6. Cámara húmeda
7. Pipeta ajustables de 20-200 µl
8. Puntas de pipeta universales
9. Material de vidrio (frasco, pipetas serológicas etc.)

Procedimiento

1. Calentar el agar hasta fundir y dispense hasta un espesor de 2-3 mm en placa petri o laminas de microscopio.
2. Cortar en el agar orificios de 5 mm utilizando un molde y remover la agarosa utilizando la trampa de vacío. El patrón del molde debe permitir colocar el antígeno y el suero adyacentes
3. Añadir 50 µl de cada uno de los reactivos
4. Incubar a temperatura ambiente en una cámara húmeda cerrada durante 24-48 horas
5. Las líneas de precipitación se observan sobre una superficie oscura y una fuente de luz

Interpretación

Un resultado es positivo cuando una línea de precipitación se forma entre el antígeno positivo y la muestra de suero contiguos.

10. TÉCNICA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IHA) PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS PARA SUBTIPO DE HEMAGLUTININA (H)

El diagnóstico serológico por IHA es un procedimiento útil cuando no se dispone de especímenes para el aislamiento viral o el RT-PCR. Se requiere de sueros pareados uno colectado en la fase aguda de la enfermedad y otra en la fase convaleciente (2-3 semanas del inicio de la enfermedad). El diagnóstico se basa en el incremento del título de anticuerpos en 4 o más diluciones entre ambos sueros. Un suero único no permite hacer el diagnóstico debido a que los humanos y animales pueden contener anticuerpos previos para los subtipos de virus circulantes.

Equipos, materiales y reactivos ver páginas 15-16

Antígenos virales de referencia:

1.	H1a	A/PR/8/34 (H1N1)
2.	H1b	A/FM/1/47(H1N1)
3.	H1c	A/swine/1A/30 (H1N1)
4.	H1d	A/swine/ 2009 (H1N1) Pandémica
5.	H3a	A/Hong Kong/68 (H3N2)
6.	H3b	A/equine/Miami/63 H3N2)
7.	H3c	A/duck/Ukraine/63 (H3N2)
8.	H5	A/tern/so.Af/61 (H5N3)
9.	H7a	A/equine/Prague/56/ (H7N7)
10.	H7b	A/FPV/Rostock/34 (H7N1)

Procedimiento

- I. Preparación de suspensión estandarizada de glóbulos rojos según se describe en la página 26
- II. Tratamiento de sueros:
 1. Tratar los sueros problema con RDE para eliminar inhibidores inespecíficos como se describe en la página 27
 2. Adsorber los sueros con glóbulos rojos para remover aglutinas como se describe en la página 28
- III. Titulación y re-titulación de los antígenos de referencia la técnica de hemaglutinación (HA) según se describe en la página 28
- IV. Determinación de título de anticuerpos inhibidores de la hemaglutinación

1. Rotular las microplacas con cada uno de los sueros problema a confrontar con cada uno de y los antígenos de referencia.
2. Añadir 25 µl de PBS (pH 7,2) en todos los pozos de la placa excepto en la primera línea (A1-A11)
3. Añadir 50 µl de PBS (pH 7,2) en los posos de la columna 12 (A12-H12) para control de glóbulos rojos
4. Añadir 50 µl de cada antisuero problema en los pozos correspondientes de la primera fila (A1-A11)
5. Preparar diluciones seriadas en base 1:2 transfiriendo 25 µl de antisuero desde la primera fila a los pozos siguientes hasta la columna 11. Descarte los últimos 25 µl de la línea H1-H12
6. Añadir 25 µl de antígeno de referencia conteniendo 4UHA/25 µl a cada una de las diluciones de los antisueros problema.
7. Mezclar bien e incubar por 15 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)
8. Añadir 50 µl de suspensión estandarizada de glóbulos rojos y mezclar bien.
9. Incubar por 15-30 minutos a temperatura ambiente (22-25°C)
10. Registre el titulo IHA

Interpretación: Si ocurre reacción antígeno/anticuerpo la hemaglutinación de los glóbulos rojos es inhibida. Utilizar los símbolos “+” para HA, “+/-” parcial y “-” para IHA.

El titulo del suero problema es la dilución más alta que inhibe totalmente la hemaglutinación del antígeno de referencia.

11. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. WHO manual on animal influenza diagnosis and surveillance. Department of communicable disease and response. Global influenza programme. WHO/CDS/CSR/NCS/2002
2. Erica Spackman, Dennis A. Senne, T. J. Myers, Leslie L. Bulaga, Lindsey P. Garber, Michael L. Perdue, Kenton Lohman, Luke T. Daum, and David L. Suarez. Development of a Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay for Type A Influenza Virus and the Avian H5 and H7Hemagglutinin Subtypes. J. CLIN. Microbiol. 2002, p. 3256–3260 Vol. 40, No. 9
3. WHO real time RT-PCR (rtRTPCR) protocol for detection and characterization of Influenza Pandemic H1 (version 2009)
4. WHO south Asian Region Guidelines on laboratory diagnosis of Avian Influenza SEE/CD/171
5. Avian influenza OIE Terrestrial Manual 2009 chapter 2.3.4: 1-20
6. Swine influenza OIE Terrestrial Manual 2009 Chapter 2.8.8: 1128 -1138
7. World Organization for animal health (OIE). Biosafety guidelines for handling pandemic H1N1 2009 influenza viruses in veterinary diagnostic Laboratories 2009
8. WHO laboratory biosafety guidelines for handling specimens containing avian influenza virus, 2009.
9. General guidelines for international shipment of samples for laboratory diagnosis OIE/FAO 2009
10. OFFLU teleconference –laboratory diagnosis of Pandemic H1N1 2009 in swine May 2009

APENDICE I

NORMAS ESTÁNDAR DE BIOSEGURIDAD

1. Higiene de las manos: Lavarse las manos con jabón y agua abundante después de remover los guantes o antes de comer
2. Equipo de protección personal: use guantes, bata de laboratorio y tapa boca cuando manipule material infeccioso.
3. Manipule todo material infeccioso o potencialmente infeccioso en el gabinete de bioseguridad.
4. En caso de derrame de material infeccioso fuera del recipiente limpiar con alcohol al 70% u otro desinfectante y dejar secar para evitar que el desinfectante entre en contacto con la muestra.
5. Asegúrese de desinfectar las superficies de trabajo después de finalizar cada trabajo con material infeccioso (lisol 10% o hipoclorito de sodio al 5%).
6. Sustituya en lo posible el material de vidrio por material de plástico descartable.
7. Evitar el movimiento de personas dentro del área de trabajo.
8. Nunca pipetear con la boca utilice el equipo apropiado.
9. Evite en lo posible la formación de aerosoles siguiendo las siguientes instrucciones:
 - i. Pipeteo: evite eliminar la última gota de la pipeta
 - ii. Maceración de tejidos: utilice el mortero en forma apropiada
 - iii. Descontamine inmediatamente si gotas de material caen en la superficie de trabajo.
10. Tenga disponible el procedimiento y un estuche con los materiales necesarios para atender inmediatamente cualquier derrame de material infeccioso:
 - a. Cubra inmediatamente la superficie con toallas absorbentes
 - b. Añada suficiente desinfectante y espere 30 minutos
 - c. Remueva los guantes y descártelos en una bolsa de autoclave
 - d. Lávese las manos con jabón y abundante agua.
 - e. Utilizando equipo de protección personal proceda a limpiar el área
11. Minimice el uso de materiales punzo penetrantes (agujas, material quirúrgico etc.)
12. Descarte cuidadosamente el material de plástico en bolsas de autoclave
13. Desinfecte el material líquido antes de su eliminación (hipoclorito de sodio al 5% o autoclave)

APENDICE II

PRUEBA DE LA NEURAMINIDASA Y DEL LA INHIBICIÓN DE LA NEURAMINIDASA

La neuraminidasa (N) es la segunda glicoproteína presente en la superficie de los virus influenza, hasta el presente se han descubierto 9 subtipos diferentes y en ella ocurre también drift antigénicos como en la hemaglutinina. Por su actividad enzimática la N disuelve el moco de la superficie del tracto respiratorio permitiendo el contacto del virus con superficie celular también tiene un función muy importante durante el proceso infeccioso a nivel celular facilitando la liberación de la partícula viral de la célula infectada. Los anticuerpos inducidos por la N confieren inmunidad al huésped.

Equipos:

1. Gabinete de bioseguridad
2. Baño de maría a 37°C
3. Mechero Bunsen
4. Centrifuga
5. Espectrofotómetro

Reactivos

1. Antisueros de referencia para los 9 subtipos de N

N1	A/New Jersey/8/76
N2	A/Singapore/1/57
N3	A/Tern/South Africa/61 and A/Turkey/England/63
N4	A/Turkey/Ontario/6118/68
N5	A/Shearwater/Australia/1/72
N6	A/Duck/England/56
N7	A/Equine/Prague/1/56
N8	A/Equine/miami/1/63
N9	A/Duck/Memphis/546/74

2. Antígenos de referencia de los 9 subtipos de N

N1	A/New Jersey/8/76
N2	A/Singapore/1/57
N3	A/Tern/South Africa/61 and A/Turkey/England/63
N4	A/Turkey/Ontario/6118/68
N5	A/Shearwater/Australia/1/72
N6	A/Duck/England/56
N7	A/Equine/Prague/1/56
N8	A/Equine/miami/1/63
N9	A/Duck/Memphis/546/74

Reactivos

1. tampón fosfato pH 5,9
2. Fetuina de suero feteal bovino (Sigma Cat # F-2379)
3. Periodato de sodio (meta (Fisher Cat # S398-100)
4. M- arsenita de sodio (Sigma S-1631)
5. Acido 2 tiobarbiturico (Easman Kodak Cat # 600)
6. Tampon fosfato salino (0,01M pH 7,3)
7. 1-Butanol
8. Acido clorhídrico
9. Agua desmineralizada

Preparación de reactivos

1. Tampón fosfato pH 5,9

Fosfato de sodio monobásico (NaH ₂ PO ₄)	0,4 M..... 27,6 g	Disolver en 500 ml de agua desmineralizada
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	0,4 M 28,4 g	Disolver en 500 ml de agua desmineralizada
Mezclar 81 ml de solución a con 19 ml de solución		
Ajuste el pH a 5,9 si es necesario. Almacene a temperatura ambiente.		

2. Fetuina (substrato)

Fetuina	0,5 g
Tampón fosfato pH 5,9	20 ml
Agua desmineralizada	20 ml
Separar en volúmenes de 5 ml y almacenar a - 20°C	

3. Solución de Periodato de sodio

Meta periodato de sodio	4,28 g
Agua desmineralizada	38 ml
Disolver por calentamiento. Dejar enfriar a temperatura ambiente	
Añadir 62 ml de ácido orto fosfórico. Mezclar bien	
Almacenar en frasco ámbar en un gabinete a temperatura ambiente	

4. Solución de Arsenita

Meta arsenita de sodio	10 g
Sulfato de sodio anhidro	7,1 g
Agua desmineralizada	100 ml
Disolver por calentamiento. Dejar enfriar a temperatura ambiente	
Añadir 0,3 ml de ácido sulfúrico concentrado	
Almacenar a temperatura ambiente	

5. Solución de tiobarbiturico

Sulfato de sodio anhidro	35,5g
Acido tiobarbiturato	3.0 g
Agua desmineralizada	500 ml
Disolver en un baño de María en ebullición	
Almacene a temperatura ambiente	

6. Reactivo de Warrenoff

1-Butanol	475 ml
Acido clorhídrico concentrado	25 ml
Almacenar en oscuridad a temperatura ambiente en el gabinete para inflamables	

7. Tampón fosfato salino (PBS) 0,01 M pH 7,2

Cloruro de sodio (NaCl)	80,0 g
Cloruro de potasio (KCl)	2.0 g
Fosfato de sodio dibásico (Na ₂ HPO ₄)	11,5 g
Fosfato de potasio dibásico anhidro (KH ₂ PO ₄)	2,0 g
Agua desmineralizada	10 lts

Recomendaciones de bioseguridad

1. Utilizar equipo de protección personal: guantes, bata, mascara y guantes
2. Realizar todo el proceso de análisis de líquidos embrionarios en el gabinete de bioseguridad ya que se pueden crear aerosoles conteniendo patógenos del tracto respiratorio
3. Aplicar las normas de bioseguridad universal cuando manipule productos de cultivo viral y utilizar precauciones especiales si se sospecha de virus influenza de alta patogenicidad o nuevos subtipos virales

I. Titulación de la neuraminidasa

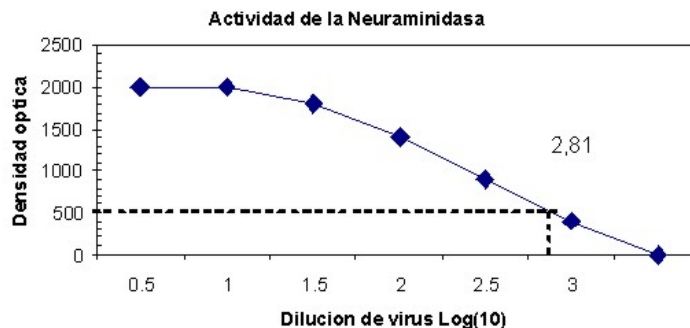
El primer paso de la prueba es estimar la cantidad de actividad de la N hay en la muestra. Para lo cual se determina la actividad enzimática por la liberación ácido sialico al reaccionar con el substrato fetuina y la reacción enzimática se detiene añadiendo arsenito. La cantidad de ácido sialico liberado se mide químicamente con el ácido tiobarbiturato que produce un color rosado proporcional a la cantidad de ácido sialico liberado. La cantidad de color es medida en el espectrofotómetro a una longitud de onda de 459 nm.

1. Preparar diluciones seriadas en PBS pH 7,3 de los antígenos de referencia y los virus aislados en base 0,5 log₁₀: 10^{-0,5}, 10⁻¹, 10^{-1,5}, 10⁻², 10^{-2,5}, 10⁻³. por ejemplo: 10^{-0,5} 0,1 ml de antígeno

no diluido + 0,216 de PBS pH 7,5, 10^{-1} transferir 0,1 ml de antígeno diluido $10^{-0,5}$ + 0,216 ml de PBS pH 7,5.

2. Trasferir 50 μ l de cada dilución de virus a los tubos correspondientes de la serie y añada 100 μ l de PBS y 100 μ l de fetuina. Como control negativo (control de fetuina) transferir 100 μ l de PBS y 100 μ l de fusina.
3. Agitar y tapar los tubos. Incubar a 37°C en baño de maría por 30 minutos. Para virus aislados con baja actividad N, incubar los tubos a a 37°C en baño de maría por 18 horas
4. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente y luego añadir 0,1 ml de solución de periodato. Agitar bien e incubar por 20 minutos
5. Preparar un bañó de maría en ebullición con el mechero y un trípode
6. Añadir 1,0 ml de solución de arsenita a cada tubo, aparecerá un color marrón. Agitar vigorosamente los tubos hasta que el color desaparezca. El contenido tendrá un aspecto lechoso.
7. Añadir 2,5 ml de solución de acido tiobarbitúrico a cada tubo. Agite vigorosamente y coloque la gradilla de tubos en el baño de maría en ebullición por 15 minutos. Se desarrolla un color rosado en proporción a la cantidad de acido liberado.
8. Colocar la gradilla de los tubos en un baño de hielo hasta enfriar.
9. Remover los tubos del baño de hielo y añadir 3,0 ml del reactivo de Warrenoff. Centrifugar los tubos 200 rpm por 10 minutos. Cuidadosamente transferir la banda superior (butanol) a una cubeta para medir la densidad óptica en el espectrofotómetro a 549nm. Calibrar previamente el espectrofotómetro con el tubo control.
10. Determine la dilución de virus a ser usada en la prueba de inhibición de la N (IN) mediante la construcción de una curva para cada antígeno de referencia y virus aislado. Las curvas deben construirse con las densidades ópticas contra las diluciones de virus. Una unidad de actividad N es definida como la dilución de virus que da una densidad óptica (DO) de 0,005 a 549 nm.

En el ejemplo de la figura N°1 la dilución de virus 1:650 ($10^{-2,81}$) contendrá 1 unidad de actividad N por 50 μ l para una DO de 0,500

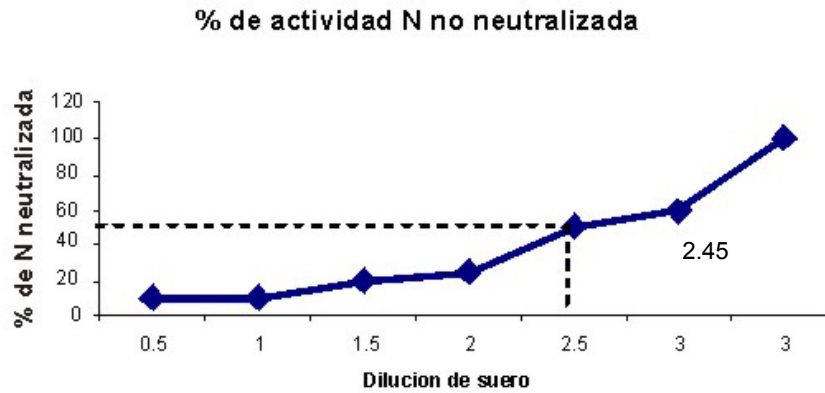


II Titulación y estandarización de los sueros de referencia

Para cada antisuero de referencia (N1-N9) usar el correspondiente antígeno de referencia, el cual debe estandarizarse a una dilución que contenga 0.500 unidades de DO.

1. Preparar diluciones seriadas de cada antisuero en PBS pH 7,5 usando el \log_{10} 0,5: $10^{-0,5}$, 10^{-1} , $10^{-1,5}$, 10^{-2} , $10^{-2,5}$, 10^{-3} ; por ejemplo: $10^{-0,5}$ 0,1 ml de suero no diluido + 0,216 de PBS pH 7,5, 10^{-1} transferir 0,1 ml de suero diluido $10^{-0,5}$ + 0,216 ml de PBS pH 7,5.
2. Rotular dos series de tubos por cada dilución de antisuero de referencia a ser analizado y control negativo, por ejemplo: 2 tubos para el antisuero no diluido, 2 tubos para la dilución $10^{-0,5}$ etc.
3. Añadir 50 μ l de cada dilución de suero en los dos tubos. Añadir 50 μ l de antígeno de referencia diluido a 0.500 unidades de DO. Añada 100 μ l de PBS pH 7,5 al control negativo (fetuina).
4. Incubar todos los tubos a temperatura ambiente por 30-60 minutos
5. Añadir 100 μ l de fetuina a cada tubo.
6. Agitar y tapar los tubos. Incubar a 37°C en baño de maría por 30 minutos. Para virus aislados con baja actividad N, incubar los tubos a 37°C en baño de maría por 18 horas
7. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente y luego añadir 0,1 ml de solución de periodato. Agitar bien e incubar por 20 minutos
8. Preparar un baño de maría en ebullición con el mechero y un trípode
9. Añadir 1,0 ml de solución de arenita a cada tubo, aparecerá un color marrón. Agitar vigorosamente los tubos hasta que el color desaparezca. El contenido tendrá un aspecto lechoso.
10. Añadir 2,5 ml de solución de ácido tiobarbitúrico a cada tubo. Agite vigorosamente y coloque la gradilla de tubos en el baño de maría en ebullición por 15 minutos. Se desarrolla un color rosado en proporción a la cantidad de ácido liberado.
11. Colocar la gradilla de los tubos en un baño de hielo hasta enfriar.
12. Remover los tubos del baño de hielo y añadir 3,0 ml del reactivo de Warrenoff. Centrifugar los tubos 200 rpm por 10 minutos. Cuidadosamente transferir la banda superior (butanol) a una cubeta para medir la densidad óptica en el espectrofotómetro a 549nm. Calibrar previamente el espectrofotómetro con el tubo control.
13. Determinar la dilución apropiada de antisuero a ser utilizada en la prueba de IN construyendo una curva de actividad N para cada antisuero analizado.
 - a. Calibrar el espectrofotómetro con los tubos control de fetuina.
 - b. Lea la densidad óptica de cada dilución de suero de referencia/antígeno. Construir las curvas confrontando el % de actividad N no neutralizada contra la dilución de suero.
 - c. Determinar la dilución de suero que causa 50% de inhibición de la actividad N

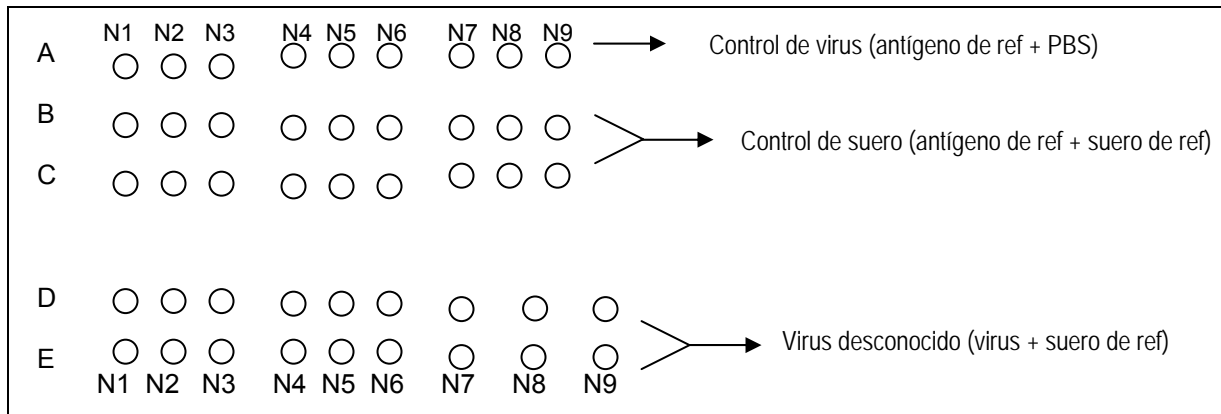
En el ejemplo de la figura N° 2 la dilución de suero 1:280 ($10^{-2,45}$) inhibirá el 50% de la actividad N de 50u/50 μ l



III. Identificación del subtipo N de virus aislados

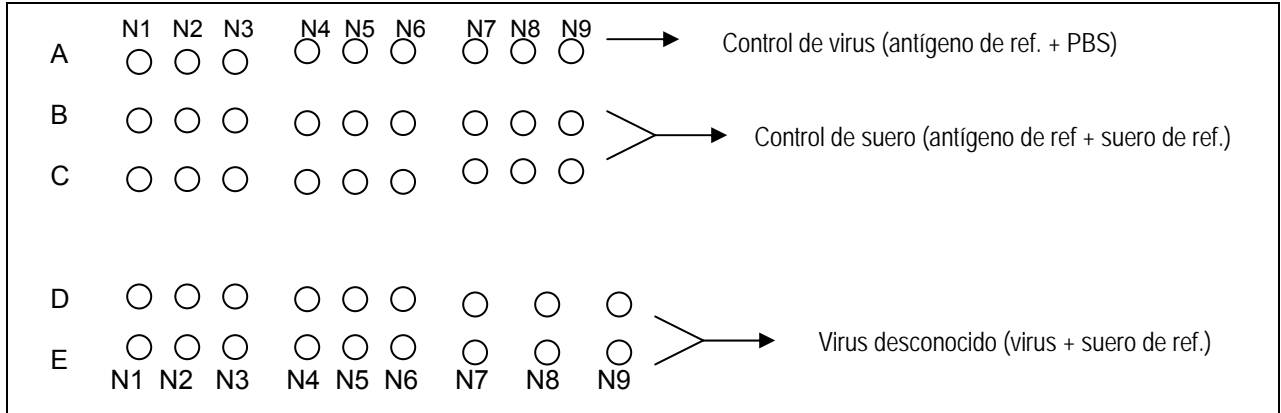
El próximo paso es la identificación del subtipo de N del virus influenza aislado de muestras clínicas utilizando antisueros específicos para cada subtipo previamente estandarizados. La reacción de inhibición de N (IN) el antisuero específico de la dilución de suero, por ejemplo 1:280 ($10^{-2,45}$), que inhibe la acción enzimática en el sustrato fetuina por lo tanto no desarrollan color.

1. Preparar un grupo de tubos rotulando por duplicado por cada una de los nueve subtipos de N y el numero del virus aislado, control negativo de antígeno de referencia y por duplicado cada control de suero de referencia y antígeno de referencia. Organizar los tubos de la siguiente manera:



2. Diluir los virus influenza aislados y antígenos de referencia en PBS pH 7,3 a la dilución que tiene un valor de 0,500 unidades de DO la (por ejemplo dilución de virus 1:650 ($10^{-2,81}$)). Por cada virus aislado se requieren 1,5 ml

3. Diluir el suero de referencia en PBS pH 7,3 a la dilución estandarizada que inhibe el 50% de la actividad N (ejemplo 1:280 (10⁻²,45). Preparar 1,5 ml de cada suero.
4. Añadir 50 µl de cada antisuero de referencia en los tubos correspondientes de cada columna excepto en la línea A (primera columna antisuero de referencia N1, segunda columna antisuero de referencia N2 etc.)



5. Añadir 50 µl de PBS pH 7,3 en los tubos la línea A (control de antígeno)
6. Añadir 50 µl de cada antígeno de referencia al correspondiente antisuero de referencia en los tubos de las línea B (segunda) y C (tercera)
7. Añadir 50 µl del virus aislado (desconocido) a cada antisuero de referencia en las líneas D (cuarta) y E (quinta).
8. Incubar los tubos a temperatura ambiente por 30-60 minutos.
9. Añadir 100 ul de fetuina a cada tubo.
10. Agitar y tapar los tubos. Incubar a 37°C en baño de maría por 30 minutos. Para virus aislados con baja actividad N, incubar los tubos a 37°C en baño de maría por 18 horas
11. Dejar enfriar los tubos a temperatura ambiente y luego añadir 0,1 ml de solución de periodato. Agitar bien e incubar por 20 minutos
12. Preparar un baño de maría en ebullición con el mechero y un trípode
13. Añadir 1,0 ml de solución de arsenita a cada tubo, aparecerá un color marrón. Agitar vigorosamente los tubos hasta que el color desaparezca. El contenido tendrá un aspecto lechoso.
14. Añadir 2,5 ml de solución de acido tiobarbitúrico a cada tubo. Agite vigorosamente y coloque la gradilla de tubos en el baño de maría en ebullición por 15 minutos. Se desarrolla un color rosado en proporción a la cantidad de acido liberado.
15. Colocar la gradilla de los tubos en un baño de hielo hasta enfriar.

16. Remover los tubos del baño de hielo y añadir 3,0 ml de reactivo de Warrenoff. Centrifugar los tubos 200 rpm por 10 minutos. Cuidadosamente transferir la banda superior (butanol) a una cubeta para medir la densidad óptica en el espectrofotómetro a 549nm. Calibrar previamente el espectrofotómetro con el tubo control.

Interpretación de resultados

1. Todos los tubos control de antígeno (N1-N9) y virus desconocido debe aparecer de color rosado indicando actividad neuraminidasa
2. Los tubos de control antígeno de referencia + antisuero de referencia deben estar incoloros indicando inhibición de la actividad neuraminidasa específica por el antisuero correspondiente.
3. Cada tubo de virus desconocido + antisuero de referencia debe compararse con los tubos control. La ausencia de color en uno de los tubos indica que la actividad neuraminidasa del virus desconocido fue inhibida por el antisuero de referencia subtipo específico

Limitaciones:

Algunos antisueros de referencia a bajas concentraciones pueden mostrar reacciones inespecíficas o reacciones cruzadas. Se recomienda no usar antisueros con bajos títulos IN

Observaciones:

Se puede utilizar la técnica de IN para el diagnóstico serológico determinando los anticuerpos N subtipo específicos en muestras de suero.

PRUEBA DE VIRULENCIA DE VIRUS INFLUENZA A AVIAR

Los subtipos de influenza aviar (H1-H16) (N1-N9) producen infecciones asintomáticas o muy leves en aves silvestres y/o domésticas. Solo algunas cepas de virus Influenza que contienen los subtipos H5 o H7 han demostrado alta virulencia causando una alta morbilidad y mortalidad en aves. De acuerdo al criterio de la OIE cualquier virus influenza A que cause letalidad a > del 75% o un índice de patogenicidad > 1,2 en pollos 4-8 semanas de edad dentro de los 10 días de inoculación intravenosa con 0,2 ml de virus (título 1:16) diluido 1:10 es clasificada como influenza aviar de alta patogenicidad (IAAP)

Se recomienda además que a todo aislamiento de virus influenza A subtipo H5 y H7 realizar análisis genómico para identificar cambios en la secuencia de AA en el sitio de escisión proteolítica de la HA (HA0)

Recomendaciones de bioseguridad:

1. Todo el proceso de análisis de patogenicidad de cepas de influenza A desconocidas debe realizarse en laboratorios de contención biológica nivel 3 o 4
2. Aplicar las normas de bioseguridad universal precauciones especiales indicadas para el nivel de contención biológica 3 o 4 durante la manipulación de material infeccioso y manejo de animales infectados
3. Utilizar el equipo de protección personal recomendado para el nivel de contención biológica 3 o 4

Procedimiento:

1. Inocular vía intravenosa 10 pollos susceptibles de 4-8 semanas de edad con 0,1 ml de virus desconocido sin diluir y diluido
2. Examinar los pollos cada 24 horas durante 10 días para observar manifestaciones clínicas de enfermedad. Cada observación de cada animal es calificado de la siguiente manera: normal = 0, enfermo = 1, severamente enfermo =2, muerto = 3. Un animal enfermo puede presentar uno o mas de los siguientes signos: Manifestaciones respiratorias, depresión, diarrea, cianosis, signos neurológicos
3. Sacrificar cualquier animal que no pueda alimentarse o tomar agua y reportarlo como muerto
4. El índice de patogenicidad será el promedio por animal por cada observación sobre el número de observaciones en el periodo de 10 días. Un índice de 3,00 significa que todos los animales murieron a las 24 horas, un índice de 0,00 significa que ningún animal presento signos clínicos en los 10 días de observación. El calculo de otros índices puede realizarse de la siguiente manera:

Signos Clínicos	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	Total	Calificación
Normal	10	10	0	0	0	0	0	0	0	0	20x0	= 0
Enfermo	0	0	3	0	0	0	0	0	0	0	3x1	= 3
Paralizado	0	0	4	5	1	0	0	0	0	0	10x2	= 20
Muerto	0	0	3	5	9	10	10	10	10	10	67x3	= 201
											Total	= 224

El índice es la calificación promedio dividido por el total de observaciones. En el ejemplo: $224/100 = 2,24$

Un virus influenza A que inoculado vía intravenosa en pollos de 4-8 semanas con un índice de patogenicidad >1,2 o cualquier virus influenza A subtipo H5 o H7 en el que se demuestre presencia de sustitución en la secuencia de nucleótidos en el sitio de la escisión proteolítica de la HA (HA0)

Ejemplos de índice de patogenicidad IV:

Altamente patogénica: 2.0-3.0 (rango 1,72-3,0)

No patogénica: 0 (rango 0-1,0)

Intermedia: 1.2- 1,4

APENDICE III

LABORATORIOS DE REFERENCIA DE LA OIE PARA INFLUENZA ANIMAL EN AMERICA

- 1 Dr John Pasick Canadian Food Inspection Agency, National Centre for Foreign Animal Disease
1015 Arlington Street, Winnipeg, Manitoba R3E 3M4 CANADA Tel: (1.204) 789.20.13 Fax: (1.204)
789.20.38 Email: jpasick@inspection.gc.ca
2. Dr B. Panigrahy National Veterinary Services Laboratories P.O. Box 844, Ames, IA 50010 UNITED
STATES OF AMERICA Tel: (1.515) 663.75.51 Fax: (1.515) 663.73.48. Email:
brundaban.panigrahy@aphis.usda.gov
3. Prof. Soren Alexandersen Director, National Centre for Foreign Animal Disease. 1015 Arlington
Street Winnipeg MB R3E 3M4 Government of Canada. Phone: +1 (204) 789-2102 / Fax: +1 (204)
789-2038. E-mail: Soren.Alexandersen@inspection.gc.ca

Editado en PANAFTOSA
Octubre de 2010



**Organización
Panamericana
de la Salud**

Oficina Regional de la
Organización Mundial de la Salud

Salud Pública Veterinaria
Centro Panamericano de Fiebre Aftosa