

\$5000

FECHA DE DEVOLUCION

El último sello marca la fecha tope para ser devuelto este libro.
 El lector pagará ²⁰\$5.00 pesos por cada día que pase ~~una~~ ~~semana~~ después del vencimiento.

- 15 ENE 1986 *Antonio*
- ~~24 ENE. 1986~~
- ~~5 FEB. 1986.~~
- 12 MAYO 1986
- 5 MAR. 1987 *g*

UNIVERSIDAD DE MONTERREY
DIVISION DE CIENCIAS NATURALES
Y EXACTAS



UNIVERSIDAD
DE MONTERREY

Clarif.
040.54
L911e
1985
c.1

Título

ESTANDARIZACION DE UN INMUNOENSAYO
ENZIMATICO PARA EL DIAGNOSTICO
DE INFLUENZA

REPORTE DEL PROGRAMA DE
EVALUACION FINAL
PRESENTADO POR

Autor **MARIA VIJAYA LOVERA RUIZ**

EN OPCION AL TITULO DE
LICENCIADO EN QUIMICA CON
ESPECIALIDAD EN ANALISIS CLINICOS

Folio
900450

MONTERREY, N. L.

MAYO DE 1985

VoBo.
Mrs. J. J. J. J. J.

A Dios ...

A mis padres y hermanos, quienes siempre me manifestaron su cariño haciendo caso omiso de la distancia.

A Lula, porque desde un principio depositó en mí su confianza y me guió con paciencia y cariño en el transcurso de estos cuatro años.

Al Dr. Gerardo Velazco, quien me brindó su ayuda desinteresada.

Al Tte. Cnel. Arnulfo Rosales y familia por haberme tendido su mano en todo momento ofreciéndome apoyo y comprensión sin condiciones.

A Joaquín Díaz Granados, por su colaboración en la realización de este proyecto.

Y en general, a México, país grande y generoso, por haber permitido realizarme como profesionalista y conocer a su maravillosa gente.

I N D I C E

	pág
INTRODUCCION	1
MATERIALES Y METODOS	12
RESULTADOS	35
DISCUSION Y CONCLUSIONES	36
RESUMEN	42
BIBLIOGRAFIA	43

I N T R O D U C C I O N

La Influenza, llamada también gripe, se considera actualmente como la única enfermedad infecciosa capaz de dar lugar a grandes epidemias aún en países con altos niveles de Salud Pública, llegando incluso al grado de producir pandemias, de las cuales se han registrado cinco en el transcurso de este siglo. Esta enfermedad es más peligrosa de lo que generalmente se cree, y por esta razón ha originado grandes polémicas.

Verger y Ausina han propuesto la siguiente definición: "La gripe o Influenza es una enfermedad infecciosa, contagiosa por vía aérea, producida por un grupo de virus. Se presen-

ta en general en forma de epidemias y con una sintomatología característica: comienzo súbito, dolor de cabeza, fiebre elevada, "trancazo" y afectación de las vías respiratorias (nariz, laringe, tráquea y bronquios). Suele evolucionar hasta la curación espontánea en 3 a 8 días, pero en ancianos, niños pequeños y en enfermos crónicos puede ser grave" (10).

El amplio espectro de la sintomatología clínica de esta enfermedad, ha dado lugar a confusiones respecto al diagnóstico de otras infecciones de las vías respiratorias, calificándolas erróneamente como "gripe". El término Influenza deriva de la palabra italiana que significa influencia o influjo; se propuso este nombre ya que se creía que los cuerpos celestes o el frío influían en la aparición de epidemias de esta enfermedad. Sin embargo, el término gripe se usa más comúnmente y proviene del francés "grippe" (catarro) (10).

Originalmente se señaló a la bacteria Haemophilus influenzae como el agente causal de esta enfermedad infecciosa, debido a que fue aislada de las secreciones de las vías respiratorias durante la pandemia de 1889. Posteriormente, en la pandemia de 1918, Nicolle y Levally demostraron que el agente etiológico no era una bacteria sino un virus filtrable. Transcurrieron varios años y en 1933, Smith, Andrews y Laidlaw, aislaron el virus de la Influenza tipo A en el

hurón. El tipo B del virus fue aislado en 1940 por Francis y Magill, y el tipo C en 1949 por Taylor (10).

De forma paralela a estas investigaciones, Burnet en 1940, logró cultivar el virus en embrión de pollo y un año después Hirst demostró que estos virus son capaces de aglutinar los glóbulos rojos de pollo, y en base a esta propiedad se desarrollaron métodos serológicos para detectar a los individuos afectados por el virus (5,10).

Actualmente los virus de la Influenza se clasifican en la familia Orthomyxoviridae, término adoptado para indicar su afinidad por las glucoproteínas.

Estos virus son esféricos, poseen una envoltura sensible al éter carente de rigidez, responsable del pleomorfismo que se observa en el primer aislamiento, la cual está constituida por proteínas y lípidos y encierra la nucleocápside de simetría helicoidal. De la envoltura se proyectan hacia el exterior las llamadas espículas, las cuales consisten de trímeros de hemaglutinina (con aspecto de bastoncillos de sección triangular) y tetrámeros de neuraminidasa (con forma de hongo: una porción esférica dentro de la envoltura, un tallo y una cabeza oblonga). El centro o núcleo consiste de la proteína M y la nucleoproteína que contiene el genoma de RNA. En base a la nucleoproteína se clasifican en tres tipos: A, B y C, y no existe reacción cruzada entre ellos (1,4).

Por la técnica de microscopía electrónica de transmisión dispersa, se ha determinado que la masa promedio del virus completo es de 174×10^6 daltons, y la de los virus a los que se les han removido las espículas, de 86×10^6 daltons. El número de espículas para el virus intacto, se ha estimado entre 400 y 500 por la diferencia entre la masa y el peso molecular conocido de las mismas. Por el mismo método se ha asumido que el espesor es de 60 nm, el diámetro para las partículas intactas de 116 nm y para las partículas libres de espículas, de 89 nm. Sin embargo, no existe un acuerdo general en cuanto a tamaño, forma y composición exacta de los virus (8).

El genoma del virus de la Influenza consiste de 8 segmentos distintos de RNA de tira única, cada uno de los cuales codifica una proteína: P1, P2 y P3, proteínas de alto peso molecular que son componentes secundarios de la nucleocápside y participan en la replicación y transcripción del RNA; la proteína NP que es el componente principal de la nucleocápside; la proteína M (matriz) asociada con el lado interno de la envoltura; la hemaglutinina (HA) y la neuraminidasa (NA), dos glucoproteínas que componen las espículas y la proteína NS cuya función se desconoce (4).

Desde el punto de vista inmunológico, los componentes de mayor importancia son la HA y la NA, debido a que los anticuerpos dirigidos hacia las demás proteínas no proporcionan

protección contra la infección, Estos dos antígenos son los que caracterizan los diferentes subtipos de los virus A y B de la gripe. Los cambios importantes en uno de estos antígenos o en ambos, son los que hacen que un virus sea "nuevo" para un organismo ya inmunizado (1).

La HA es responsable de la especificidad antigénica, de la adherencia del virus a la célula huésped que favorece las primeras etapas de la infección y de la aglutinación de los glóbulos rojos de pollo y de otras especies. Esta última propiedad, llamada hemaglutinación, refleja el hecho de que esos eritrocitos poseen receptores para ciertos componentes de la HA de las partículas virales.

La NA es una enzima similar a la del Vibrio cholerae (enzima destructora de receptores), que hidroliza el enlace ácido N-acetilneuramínico-galactosa al final de las cadenas del oligosacárido de las glucoproteínas y lípidos de la membrana de la célula huésped, liberando de esta manera, ácido N-acetilneuramínico (4).

Las HA poseen una fuerte afinidad por los residuos de ácido N-acetilneuramínico-galactosa, por lo tanto, destruyendo los agregados formados por este antígeno por medio de la NA, se favorece la liberación de los virus que de otra manera no ocurriría o serían reabsorbidos inmediatamente después de este proceso. Debido a esto, la función primaria

de la NA parece ser la de permitir la liberación de las partículas virales formadas en la célula parasitada, favoreciendo así la diseminación de la infección (1,4,5).

Los virus de la Influenza presentan dos tipos de variaciones en sus antígenos superficiales. El primer tipo de variación, llamado cambio antigénico menor (drift), consiste en una serie de alteraciones menores de los determinantes antigénicos, tanto de la HA como de la NA. La segunda variación o cambio antigénico mayor (shift), implica la aparición de una nueva espícula de HA y/o NA. Ambos tipos de variación se observan en los virus de la Influenza tipo A, y en los virus tipo B sólo se ha detectado el cambio antigénico menor. Por esta razón los virus tipo A son los responsables de todas las pandemias registradas (5).

A partir de 1972, la Organización Mundial de la Salud, ha designado una nueva nomenclatura para estos virus, basada en sus antígenos HA y NA, permitiéndole así la uniformidad en su descripción. Primero se indica el tipo A, B o C, de acuerdo a la ribonucleoproteína. Enseguida se consigna el huésped no humano del cual se ha aislado la cepa, origen geográfico, número de la cepa y fecha de su aislamiento. Además para el virus A, se señala entre paréntesis el carácter antigénico de la HA y NA. Como ejemplos se pueden citar las cepas: A/Filipinas/82 (H3N2), A/Chile/83 (H1N1) y B/URSS/79; las cuales se encuentran circulando actual-

mente (10).

Una epidemia de Influenza se inicia cuando el virus sufre un cambio antigénico menor en sus antígenos de superficie, particularmente en la molécula de HA y la población no posee anticuerpos contra él o son escasos. Por otra parte, si el virus experimenta un cambio antigénico mayor, aparecerá como consecuencia una nueva cepa pandémica, ya que los individuos no poseerán anticuerpos contra la espícula de HA y/o NA (5,10).

El diagnóstico de la Influenza se puede realizar por medio del aislamiento del virus de lavados nasales o faríngeos en embrión de pollo o cultivos de células, o por la determinación del título de anticuerpos.

Para lograr la recuperación del virus, la muestra se toma dentro de los tres días siguientes al comienzo de la enfermedad y se trata con antibióticos. A continuación, se inocula en las cavidades amniótica y alantoidea del embrión de pollo de 10 días y se incuba a 33°C por 3 días, al cabo de los cuales se ejecutan pruebas de hemaglutinación con glóbulos rojos de pollo. Si dichas pruebas son negativas, se repiten al menos dos pasajes en embriones nuevos. En caso de hemaglutinación positiva, el virus se identifica por la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IHA) con antisueros específicos (3,7).

El método más utilizado para el diagnóstico serológico es la IHA, por medio de la cual se cuantifican los anticuerpos en los sueros del paciente obtenidos en la fase aguda de la enfermedad y durante la convalecencia. Se considera un diagnóstico positivo cuando se demuestra un aumento de 4 veces en el título de anticuerpos (2).

La IHA consiste en la unión de los anticuerpos presentes en el suero del paciente con la hemaglutinina viral, impidiendo de esta forma la aglutinación de los glóbulos rojos de pollo (2).

Esta prueba posee varios problemas prácticos: los inhibidores no específicos contenidos en los sueros conducen a resultados falsos positivos, causando errores en la identificación del nuevo virus; la IHA puede resultar positiva por la presencia de anticuerpos contra la NA o contra antígenos del propio huésped. La lectura no objetiva del resultado es otra fuente de error, ya que el arreglo de los patrones de los glóbulos rojos normales en presencia de altas concentraciones de proteínas en sueros muy diluidos, se pueden malinterpretar como inhibición. Por último, su tiempo de ejecución es largo para el propósito de administrar un tratamiento rápido al paciente (2).

Debido a que el diagnóstico de Influenza consume mucho tiempo, hay mucho interés y actividad en el desarrollo de téc-

nicas para acelerarlo, lo cual permitiría la administración del tratamiento adecuado a los pacientes o sus contactos y el control de la enfermedad en la comunidad. El mayor énfasis se ha dado a las técnicas que permiten la detección viral directamente en el espécimen clínico, ya que ésto evitaría la necesidad de cultivar el agente (9).

Los métodos directos usados para la detección viral incluyen la microscopía electrónica y varios inmunoensayos basados en demostrar la reactividad del antígeno viral en la muestra clínica con un antisuero viral conocido. El uso de inmunoensayos para la identificación más rápida de virus aislados en embriones de pollo y para la detección selectiva del antígeno viral en cultivos de células inoculados aún antes de que los agentes produzcan un efecto observable, ha sido un avance importante en el diagnóstico de la Influenza (9).

Entre los métodos de inmunoensayo más recientes, se encuentra el de ELISA (Enzyme-linked Immunosorbent Assay), el cual está siendo utilizado para la detección directa de antígenos virales en líquidos corporales. Las ventajas de este ensayo incluyen un alto grado de sensibilidad que resulta de la amplificación de la reacción enzima-sustrato, el uso de puntos finales objetivos sin necesidad de radioactividad y un tiempo de ejecución relativamente corto (12).

En la técnica ELISA se usan inmunorreactivos unidos a una enzima y enlazados a una fase sólida por una serie de reacciones antígeno-anticuerpo, las cuales se miden por una reacción enzima-sustrato (12).

Debido a que las enzimas usadas en este ensayo son estables bajo una variedad de condiciones de almacenamiento, los inmunorreactivos marcados con enzima pueden ser conservados por largos períodos. Además, estas enzimas catalizan reacciones que resultan en la generación de productos coloreados, lo cual se vuelve una ventaja sobre las otras técnicas (aglutinación, radioactividad, IHA, etc.), porque las reacciones antígeno-anticuerpo pueden ser medidas objetivamente en un espectrofotómetro (11,12).

En ELISA, como ensayo para detectar antígeno en las muestras clínicas, se une un anticuerpo no marcado a una fase sólida tal como la cavidad de una placa de microtitulación; esta unión puede ser por simple adsorción de la inmunoglobulina a la fase sólida o por la formación de un enlace covalente. Después de este procedimiento, la fase sólida puede conservarse hasta su uso posterior (11,12).

Cuando se obtiene la muestra clínica, ésta se añade a la fase sólida y se incuba para luego añadir el anticuerpo marcado con la enzima, el cual reaccionará con el antígeno si se encuentra presente. Posteriormente se añade el sustrato de

la enzima y la reacción enzima-sustrato se mide cuantificando los productos generados. La concentración de dichos productos es proporcional a la del antígeno en el espécimen clínico. Por lo tanto, la cantidad de antígeno se determina por comparación de la reactividad del espécimen de prueba con la de los controles positivo y negativo adecuados (12).

En base a lo anterior, el propósito del presente trabajo es estandarizar un ensayo inmunoenzimático (ELISA) para el diagnóstico de la Influenza.

M A T E R I A L E S Y M E T O D O S

La estandarización del ensayo inmunoenzimático para el diagnóstico de Influenza se llevó a cabo en el Laboratorio de Microbiología de la División de Ciencias Naturales y Exactas de la Universidad de Monterrey, durante los meses de Febrero a Abril de 1985.

Para la realización de este estudio, se utilizó una cepa del virus de la Influenza A/Brasil/77 (H1N1), ejecutándose las técnicas descritas a continuación:

INMUNIZACION DEL CONEJO PARA LA OBTENCION DE ANTICUERPOS:

1. Rasurar la espalda del conejo.
2. Emulsificar el antígeno con el adyuvante completo de Freund (SIGMA), en una proporción 1:2.
3. Inocular el conejo intradérmicamente en sitios múltiples.
4. Dejar transcurrir dos semanas.
5. Emulsificar el antígeno con el adyuvante incompleto de Freund (SIGMA), en una proporción 1:2.
6. Inocular el conejo intradérmicamente en sitios múltiples.
7. Dejar transcurrir dos semanas.
8. Inocular intraperitonealmente 1 ml del antígeno diluído en solución salina estéril (R-6C).
9. Dejar transcurrir dos semanas.
10. Obtener 20 ml de sangre e inocular intraperitonealmen-

mecánico y agregar a cada cavidad 0.05 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% (R-3).

5. Incubar la placa a temperatura ambiente (25°C), hasta que las células de las cavidades del control de eritrocitos formen un modelo negativo compacto. (Usualmente 30 min.).
6. Leer y registrar los modelos celulares en la base de las cavidades. (Leer inmediatamente ya que los virus pueden eluirse de los eritrocitos y cambiar los patrones de hemaglutinación).
7. La última cavidad (la dilución más alta del virus) que muestre hemaglutinación completa es el punto final de la titulación.
8. Determinar la dilución del antígeno que contiene 4 unidades hemaglutinantes en 0.025 ml, dividiendo el factor de dilución del punto final entre 8.
9. Almacenar el antígeno diluido a 4°C.

B. Retrotitulación del antígeno hemaglutinante para la prueba de IHA:

1. Añadir 0.05 ml de PBS, pH 7.2 (R-1), en las cavidades 1 a la 5 de cada línea vertical y a las dos cavidades del control de eritrocitos de la placa de microtitulación.
2. Agregar 0.05 ml del antígeno de prueba a la primera cavidad de la placa.
3. Preparar con un dilutor de 0.05 ml, diluciones seriadas al doble del antígeno de prueba hasta la cavidad 5.
4. Colocar la placa de microtitulación en un vibrador mecánico y agregar 0.05 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% a todas las cavidades de la placa.
5. Incubar la placa a temperatura ambiente por 30 min.
6. Leer y registrar los modelos celulares en la base de las cavidades.
7. Interpretar los resultados de la retrotitulación en la siguiente forma:
 - a) Si el antígeno de prueba contiene 4 unidades hemaglutinantes en 0.025 ml, las tres primeras

cavidades muestran hemaglutinación completa y las cavidades 4 y 5, parcial o nula.

- b) Si el antígeno no contiene las 4 unidades requeridas, debe ser ajustado, repitiéndose la retrotitulación con la misma suspensión de eritrocitos.

8. Almacenar el antígeno de prueba a 4°C.

C. Inhibición de la hemaglutinación:

- a) Tratamiento de los sueros con enzima destructora de receptores para eliminar los inhibidores inespecíficos:

1. Dividir el título de la solución stock de enzima destructora de receptores (EDR) entre 100 para obtener el factor de dilución que se requiere para preparar la solución de trabajo que contiene 100 unidades por ml.

2. Estimar el volumen necesario de la solución de trabajo de la EDR (cada 0.1 ml de suero se trata con 0.4 ml de la solución).

3. Preparar el volumen apropiado de la solución de

trabajo de la EDR diluyendo el stock con solución salina de calcio (R-4), usando el factor de dilución obtenido.

4. A 0.1 ml del suero añadir 0.4 ml de la solución de trabajo de la EDR y mezclar.
5. Incubar en baño de agua a 37°C por 16 a 18 hr.
6. Añadir 0.3 ml de solución de citrato de sodio al 2.5% (R-5), y mezclar.
7. Incubar en baño de agua a 56°C por 30 min.
8. Añadir 0.2 ml de PBS, pH 7.2 (R-1), y mezclar.

b) Ejecución de la prueba IHA:

1. Colocar 0.025 ml de PBS, pH 7.2 (R-1), en las cavidades 2 a la 10 en la placa de prueba y 2 a la 5 en la placa control, y 0.05 ml en las dos cavidades del control de eritrocitos.
2. Colocar 0.05 ml de los sueros para el control positivo y negativo y del suero de prueba tratados con EDR en la cavidad 1 de la placa corres-

pondiente.

3. Preparar con un dilutor de 0.025 ml, diluciones seriadas al doble de los sueros hasta la última cavidad de las placas.
4. Agregar 0.025 ml del virus de prueba que contiene 4 unidades hemaglutinantes en 0.025 ml a todas las cavidades de la placa de prueba.
5. Agregar 0.025 ml de PBS a todas las cavidades de la placa control.
6. Mezclar los contenidos de las placas.
7. Cubrir las placas e incubar a temperatura ambiente por 30 min.
8. Colocar las placas en un vibrador mecánico y agregar 0.05 ml de una suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5% a todas las cavidades de la placa.
9. Cubrir las placas e incubar a temperatura ambiente por 30-45 min.

10. Leer y registrar los modelos celulares en la base de las cavidades de las placas.

11. La última cavidad (la dilución más alta del suero) que muestre inhibición de la hemaglutinación es el punto final de la titulación.

PURIFICACION DE LOS ANTICUERPOS:

1. A una mezcla de 1.0 ml de antisuero y 1.0 ml de solución salina buffer de fosfatos (PBS), pH 7.4 (R-6), añadir 2.0 ml de Na_2SO_4 al 36% (R-7), mezclar y agitar por 30 min. a temperatura ambiente.
2. Centrifugar a 3,000 x g por 10 min. Descartar el sobrenadante y lavar el precipitado dos veces con solución de Na_2SO_4 al 18% (R-8). Centrifugar y descartar el sobrenadante.
3. Disolver el precipitado en 0.8 ml de PBS (R-1). Añadir una cantidad igual de solución de Na_2SO_4 al 24% (R-9), y centrifugar a 3,000 x g por 10 min. Lavar el precipitado con Na_2SO_4 al 12% (R10).
4. Redisolver el precipitado en 1.0 ml de PBS y transferir a un tubo de diálisis. Dializar a 4°C contra PBS por

24 horas.

5. Determinar la concentración de proteínas.

CUANTIFICACION DE LOS ANTICUERPOS POR EL METODO DE BIURET:

1. Pipetear en tubos de ensayo:

	Blanco	Patrón	Problema
Suero	-	-	0.1 ml
Patrón	-	0.1 ml	-
Reactivo de Biuret	5.0 ml	5.0 ml	5.0 ml

2. Mezclar e incubar en baño de agua a 37°C por 15 min.
3. Medir la absorbancia del patrón y del problema contra el blanco a 545 nm.
4. Determinar la concentración de proteínas en base a la fórmula:

$$\text{Proteínas totales en g\%} = \frac{A_{\text{Prob}}}{A_{\text{Patr}}} \times 4$$

PREPARACION DEL CONJUGADO: ANTICUERPO - PEROXIDASA:

- A. Método del peryodato:

1. A 4 mg de peroxidasa (SIGMA) en 1 ml de agua destilada, añadir 0.2 ml de NaIO_4 0.1 M (R-12) recién preparado, y agitar por 20 min. (En la adición del peryodato, la solución debe cambiar de dorado a verde; si no es así, se requiere prepara nuevo NaIO_4).
2. Dializar la mezcla contra un buffer de acetato de sodio 1 mM, pH 4.4 (R-13), toda la noche a 4°C.
3. Elevar el pH por adición de 0.02 ml de buffer de carbonato de sodio 0.2 M, pH 9.5 (R-14).
4. Añadir inmediatamente 8 mg de anticuerpo en 1 ml de buffer de carbonato de sodio (R-14). Agitar por 2 horas a temperatura ambiente.
5. Añadir 0.1 ml de borohidruro de sodio recién preparado (R-15). Dejar reposar por 2 horas a 4°C. Precipitar con sulfato de amonio saturado.

B. Purificación de los conjugados:

1. Añadir un volumen igual de solución de sulfato de amonio saturada (R-16), neutra y fría, gota a gota y agitando.

2. Centrifugar y lavar el precipitado dos veces con solución de sulfato de amonio semi-saturada (R-17), fría.
3. Redisolver el precipitado en PBS (R-1), y dializar contra PBS para remover el sulfato de amonio.

Los conjugados de peroxidasa pueden ser almacenados a 4°C si se añade glicerol a una concentración final del 50% junto con albúmina sérica bovina al 1% o albúmina de huevo. Alternativamente, pueden ser conservados congelados a 4°C o menos, en alícuotas, o pueden ser liofilizados.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DEL CONJUGADO:

1. Preparar diluciones de suero de conejo hiperinmune 1:10, 1:50, 1:100 y 1:200, y diluciones similares de suero normal de conejo en buffer de carbonato de sodio 0.05 M, pH 9.6, con azida de sodio al 0.2% como preservativo (R-18).
2. Comenzando con la dilución más alta de anticuerpo (la más diluída), añadir 0.05 ml a cada una de las cavidades A4-E4, luego la dilución A3-E3, y así sucesivamente. Las diluciones correspondientes al suero normal de conejo se colocan en las cavidades A9-E9, luego las siguientes.

tes A8-E8, y así sucesivamente. Marcar el área de la placa que se está utilizando.

3. Cubrir la placa e incubar a 4°C toda la noche o hasta que se requiera.

ESTANDARIZACION DE ELISA CON CONTROLES POSITIVO Y NEGATIVO:

1. Vaciar las cavidades de la placa usando una pipeta Pasteur unida a un aparato de succión. Lavar tres veces con PBS-Tween (R-20). Llenar la mitad de cada cavidad con líquido de lavado, dejar reposar 3 min. y vaciar cada vez.
2. Diluir el antígeno 1:2 en PBS-Tween-BSA-EDTA (R-21). Añadir 0,05 ml a las cavidades de las líneas A-D, y diluyente a la línea E.
3. Cubrir la placa e incubar a 37°C por 1 hora.
4. Lavar tres veces como en el paso 1.
5. Preparar diluciones del conjugado 1:25, 1:50, 1:100 y 1:200 en PBS-Tween-BSA (R-22). Añadir 0,05 ml de la dilución 1:200 a las cavidades de la línea D y E4 y E9.

Añadir 0.05 ml de la dilución 1:100 a las cavidades de la línea C y E3 y E8.

Y así sucesivamente.

Así, la línea E contiene controles sin antígeno y algunas de las combinaciones de los sueros.

6. Incubar 1 hora a 37°C.
7. Lavar tres veces como en el paso 1.
8. Añadir 0.1 ml del sustrato a cada cavidad e incubar a temperatura ambiente por 30 min. en ausencia de luz. Añadir H_2SO_4 2.5 M (R-24), para detener la reacción.
9. Leer los resultados en un espectrofotómetro DYNATECH a 488 nm.
10. La concentración óptima del anticuerpo de captura y del conjugado será la dilución más alta cuyo valor de absorbancia sea el doble del correspondiente a su control negativo. Los controles que no contienen antígeno (línea E), indican si el conjugado está enlazado inespecíficamente.

REACTIVOS:

R-0. Solución stock buffer de fosfatos, pH 7.2:

Na_2HPO_4	5.480	g
NaH_2PO_4	1.575	g
Agua destilada cbp	200.000	ml

Disolver los reactivos en agua destilada y aforar a 200 ml.

R-1. Solución de trabajo buffer de fosfatos, pH 7.2:

Solución stock (R-0)	40.000	ml
NaCl	8.500	g
Agua destilada cbp	1.000	L

Ajustar el pH con NaOH 1 N o con HCl 1 N, según se requiera. Almacenar a 4°C por no más de una semana.

R-2. Solución de Alsever:

Dextrosa	20.500	g
$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	8.000	g
NaCl	4.200	g
$\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$	0.550	g
Agua destilada cbp	1.000	L

Disolver los reactivos por separado, mezclarlos y aforar a 1 L. Ajustar el pH con NaOH 1 N o con HCl 1 N, según se requiera. Esterilizar por filtración a través de una membrana MILLIPORE de 0.22 micrómetros. Almacenar a 4°C. Descartar al primer signo de contaminación o cambio de pH.

R-3. Suspensión de eritrocitos de pollo al 0.5%:

A. Obtención de los eritrocitos:

1. Añadir asépticamente 50 ml de la solución de Alsever (R-2), a un matraz erlenmeyer con tapón de rosca de 125 ml.
2. Colocar 15 ml de R-2 en una jeringa hipodérmica de 50 ml con aguja #18 de 9 cm.
3. Obtener 15 ml de sangre.
4. Retirar la aguja y mezclar rápidamente el contenido de la jeringa, y transferirlo al matraz que contiene el resto de la solución R-2.

B. Lavado de los eritrocitos:

1. Colocar 1 ml del paquete de eritrocitos de pollo en un tubo cónico y llenar hasta la marca superior con PBS, pH 7.2 (R-1).
2. Centrifugar a 900 x g por 5 min.
3. Remover el sobrenadante y la capa de glóbulos blancos.
4. Resuspender las células con PBS (R-1), y repetir el procedimiento dos veces, centrifugando por 10 min. la tercera ocasión.
5. Preparar una suspensión al 0.5%, y almacenar a 4°C hasta que se requiera.

R-4. Solución salina de calcio:

$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.000 g
NaCl	9.000 g
H_3BO_3	1.203 g
$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$	0.052 g
Agua destilada cbp	1.000 L

Si se usa inmediatamente no requiere esterilización.
 Si se almacena por más de una semana, esterilizar en autoclave o por filtración a través de una membrana

MILLIPORE de 0.22 micrómetros. Conservar a temperatura ambiente.

R-5. Solución de citrato de sodio al 2.5%:

$\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.660 g
Agua destilada cbp 100.000 ml

Esterilizar por filtración a través de una membrana MILLIPORE de 0.22 micrómetros. Conservar a 4°C.

R-6. Salina buffer de fosfatos, pH 7.4:

Carne 6,190. =
A. agua 1,238. =
300 g
1000 L
15 lb por 15 min.
23,870 g
1.000 L
e a 15 lb por 15 min.

C. Solución salina al 0.765%:

NaCl	7.650	g
Agua destilada cbp	900.000	ml

Preparar la solución de trabajo, pH 7.4, mezclando 80 ml de la solución A y 20 ml de la solución B, y agregar la mezcla a 900 ml de solución salina.

R-7. Solución de sulfato de sodio al 36%:

Na_2SO_4	36.000	g
Agua destilada cbp	100.000	ml

R-8. Solución de sulfato de sodio al 18%:

Na_2SO_4	18.000	g
Agua destilada cbp	100.000	ml

R-9. Solución de sulfato de sodio al 24%:

Na_2SO_4	24.000	g
Agua destilada cbp	100.000	ml

R-10. Solución de sulfato de sodio al 12%:

Na_2SO_4	12.000	g
Agua destilada cbp	100.000	ml

R-12. Solución de peryodato de sodio, 0.1 M:

NaIO_4	0.2139	g
Agua destilada cbp	10.000	ml

R-13. Solución buffer de acetato de sodio 0.2 M, pH 4.4:

A. Acido acético:

CH_3COOH	12.000	g
Agua destilada cbp	1.000	L

B. Acetato de sodio:

CH_3COONa	16.400	g
Agua destilada cbp	1.000	L

Preparar la solución de trabajo, pH 4.4, mezclando 30.5 ml de la solución A y 19.5 ml de la solución B, y aforando a 100 ml.

R-14. Solución buffer de carbonato de sodio 0.2 M, pH 9.5:

A. Carbonato de sodio:

Na_2CO_3	21.100 g
Agua destilada cbp	1.000 L

B. Bicarbonato de sodio:

NaHCO_3	16.800 g
Agua destilada cbp	1.000 L

Preparar la solución de trabajo, pH 9.5, mezclando 13 ml de la solución A y 37 ml de la solución B, y aforando a 200 ml.

R-15. Solución de borohidruro de sodio:

NaBH_4	4 mg
Agua destilada cbp	1 ml

R-16. Solución de sulfato de amonio saturada:

Agregar $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ a 500 ml de agua destilada hasta saturar.

R-17. Solución de sulfato de amonio semi-saturada:

Mezclar volúmenes iguales de la solución R-16 y agua destilada.

R-18. Solución buffer de carbonatos 0.05 M, pH 9.6, con azida de sodio al 0.02%:

Na_2CO_3	1.590	g
NaHCO_3	2.930	g
NaN_3	0.200	g
Agua destilada c á p	1.000	L

R-19. Solución salina buffer de fosfatos, pH 7.2:

NaCl	8.000	g
KH_2PO_4	0.200	g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	2.890	g
Agua destilada c á p	1.000	L

R-20. Solución de lavado, PBS-Tween:

PBS, pH 7.2 (R-19), más Tween 20 (SIGMA) 0.5 ml/L.
Conservar a 4°C.

R-21. Solución diluyente, PBS-Tween-BSA-EDTA, 0.01 M:

PBS, pH 7.2 (R-19), más 0.5 ml de Tween 20 y 5 g de

BSA (SIGMA) y 3.72 g de $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ por litro.
Conservar congelado.

R-22. Sustrato de la peroxidasa:

OPD (di-hidrocloruro de o-fenilendiamina, SIGMA).

Buffer de citrato-fosfato, pH 5.0:

Acido cítrico 0.1 M	24.300 ml
Na_2HPO_4 0.2 M	25.700 ml
Agua destilada cbp	100.000 ml

Inmediatamente antes de usar, disolver 10 mg de OPD en 25 ml del Buffer y añadir 0.01 ml de H_2O_2 al 30%. Para detener la reacción, añadir 1/4 volumen de H_2SO_4 2.5 M (R-24).

R-24. Solución de ácido sulfúrico 2.5 M:

H_2SO_4 18M	13.890 ml
Agua destilada cbp	100.000 ml

R E S U L T A D O S

Las condiciones óptimas determinadas en la estandarización de la técnica ELISA para el diagnóstico de Influenza tipo A fueron las siguientes:

-Dilución del anticuerpo de captura (suero hiperinmune):

1:100

-Dilución del virus de la Influenza A/Brasil/77 (H1N1):

1:2

-Dilución del conjugado anticuerpo-peroxidasa:

1:25

D I S C U S I O N Y C O N C L U S I O N E S

La alta frecuencia de Influenza en el mundo, principalmente en la época de invierno, constituye no sólo un problema de Salud Pública, sino que también repercute en la economía de un país porque afecta a un número grande de adultos en edad productiva y por el alto costo que implica el tratamiento de las personas afectadas (7).

Farr en 1885, 50 años antes del aislamiento del virus, reconoció el hecho de que durante las epidemias de Influenza, se presentaba un incremento en la mortalidad independientemente de la enfermedad de base. Las estadísticas modernas todavía muestran este fenómeno.

En México, es la enfermedad de las vías respiratorias más importante en cuanto a su morbi-mortalidad. En 1981, se registraron 2,935 defunciones por Influenza y 40,323 por neumonía con una tasa de 65.7 por 100,000 habitantes.

Por otra parte, los cambios antigénicos del virus dan lugar a epidemias, en ocasiones tan extensas que llegan a ser verdaderas pandemias, debido a que el período de incubación es muy corto y a la rapidez con que se multiplica el virus en el epitelio respiratorio del huésped (7).

Por lo expuesto anteriormente, ha surgido la necesidad de desarrollar una técnica específica y sensible para el diagnóstico rápido de la Influenza, que a su vez sea útil para detectar los cambios antigénicos del virus con el objeto de contribuir al control de la enfermedad y de administrar tratamiento adecuado a los pacientes afectados.

Los resultados obtenidos en la estandarización de la ELISA para el diagnóstico de la Influenza tipo A, están sujetos a una serie de limitaciones inherentes a las condiciones de trabajo en el laboratorio.

El virus usado para la inmunización de los animales de laboratorio fue inoculado directamente, sin ser concentrado y purificado por técnicas fisicoquímicas, por lo que el título de anticuerpos es bajo en relación al que se obtiene i-

noculando un alto título de unidades hemaglutinantes virales.

En relación a la especificidad y sensibilidad de la técnica ELISA, el factor determinante es el anticuerpo de captura, es decir, el inmunoensayo depende de la avidéz y concentración del mismo (12).

Por otra parte, estos parámetros también dependen de las propiedades del conjugado. Debido al peso molecular de la peroxidasa (40,000), la conjugación puede producir un bloqueo parcial de los sitios activos de la molécula de anticuerpo o de la molécula de enzima por impedimento estérico. Esto conduce a un conjugado con menor actividad enzimática e inmunoglobulínica. En el caso del presente estudio, esta desventaja se suma a la baja concentración de anticuerpos obtenida para la preparación del conjugado, por lo cual la dilución óptima determinada para este último fue de 1:25, muy baja en comparación con la reportada en la literatura (11,12).

Otro factor que influye en la sensibilidad de esta prueba es la selección de la enzima usada en la preparación del conjugado, la cual debe satisfacer los siguientes requisitos:

1. Debe ser relativamente estable a 25°C y a 37°C y poder conservarse a 4°C al menos durante seis meses.

2. La enzima purificada debe ser accesible.
3. La actividad de la enzima debe ser de fácil medición por métodos colorimétricos o fluorométricos.
4. Debe tener un alto número de conversión del sustrato y el producto de reacción un gran coeficiente de extinción molar o fluorescencia molar.

En este estudio se seleccionó la enzima peroxidasa porque cumple, en general, con las condiciones antes mencionadas, a pesar de que la determinación de su actividad involucra varias reacciones de óxido-reducción y el sustrato, H_2O_2 , es inestable (6).

La característica que distingue la ELISA de otros inmunoensayos enzimáticos es el uso de un inmunoadsorbente que permite efectuar una separación fácil y rápida de los reactivos libres del complejo antígeno-anticuerpo. Las placas de microtitulación usadas en la realización de este ensayo fueron de poliestireno, material que puede ser cubierto fácilmente y reproduciblemente por las proteínas. Sin embargo, presenta algunas desventajas, de las cuales la más importante es que la unión del anticuerpo se lleva a cabo por adsorción física sin la formación de un enlace covalente, lo cual limita su capacidad de adsorción (6).

Durante la incubación, el anticuerpo marcado con enzima se une específicamente al antígeno, pero también puede ser ad-

sorbido directamente a la fase sólida, debido a que el proceso de adsorción es inespecífico, y ésto puede conducir a resultados falsos positivos. Para disminuir este problema, se usa Tween 20 como detergente neutro en una concentración tal que evita la formación de nuevas interacciones hidrofóbicas entre las proteínas añadidas y la fase sólida, sin hidrolizar los enlaces ya formados (6).

Respecto a la precisión y reproducibilidad del ensayo, una fuente de variación puede ser la adsorción no uniforme del anticuerpo a la fase sólida durante la etapa de inmovilización, debido al uso de material plástico heterogéneo. Sin embargo, en la actualidad se dispone comercialmente de placas de microtitulación para ELISA con alto grado de homogeneidad (6).

El presente trabajo sólo se limitó a estandarizar la técnica ELISA, sin embargo, es recomendable evaluarla para futuros trabajos a gran escala utilizando especímenes clínicos obtenidos de personas con síntomas de enfermedad respiratoria aguda.

Por último, se puede concluir que por su fácil ejecución, bajo costo de instrumentación, uso de materiales no peligrosos y por el efecto de amplificación proporcionado por la enzima, entre otras ventajas, la técnica ELISA puede

ser aplicada en el diagnóstico de numerosas enfermedades
infecciosas incluyendo la Influenza.

R E S U M E N

Se estandarizó un inmunoensayo enzimático (ELISA) para el diagnóstico de la Influenza tipo A, utilizándose como antígeno de prueba una cepa del virus de la Influenza: A/Brasil/77 (H1N1).

B I B L I O G R A F I A

1. Conacyt, 1980. La Gripe. Inf. Cient. Tec. 11:5-9.
2. Department of Health, Education, and Welfare Public Health Service. CDC, 1975. IHA. Advanced Laboratory Techniques dor Influenza Diagnosis. USA.
3. Jawetz, E. et al. 1974. Review of Medical Microbiology. 11th ed. Lange Medical Publications, USA.
4. Joklik, W. K. et al. 1980. Zinsser Microbiology. 17th ed. Appleton-Century-Crofts, USA.

5. Kaplan, M. and R. G. Webster. 1977. The Epidemiology of Influenza. *Sci. Amer.* 237:88-106.
6. Maggio, Edward T. (Ed.). 1980. *Enzyme-Immunoassay*. CRC Press, Inc, USA.
7. Pizarro E. y otros. 1977. Vigilancia Epidemiológica de la Influenza. Brote Epidémico Ocurrido en México, D.F., en Febrero de 1976. *Sal Púb. Méx.* XIX:681-683.
8. Ruigrok, R. W. et al. 1984. Characterization of Three Highly Purified Influenza Virus Strains by Electron Microscopy. *J. Gen. Virol.* 65:799-802.
9. Schmidt, N. J. 1984. Rapid Viral Diagnosis. *Virology* 14:217.
10. Verger G. y V. Ausina. 1978. *La Gripe. Una Epidemia Moderna*. Ed. La Gaya Ciencia, Barcelona, España.
11. Voller, A., D. Bidwell and A. Bartlett. 1980. Enzyme-linked Immunosorbent Assay. In: *Manual of Clinical Immunology*. Rose N. R. and H. Friedman (Eds.). American Society for Microbiology, Washington, D.C.
12. Yolken, R. H. 1982. Enzyme Immunoassays for Detection of Infectious Antigens in Body Fluids: Current

Limitations and Future Prospects. Rev. Infect. Dis.

4:35-59.

900450