



JUN 27, 2023

OPEN ACCESS

DOI:
dx.doi.org/10.17504/protocols.io.rm7vzbpxvx1/v1

Protocol Citation: Delia Piedad Recalde-Reyes, Juliana Lopez Calderon 2023. Técnica de inmunofluorescencia indirecta para detección de dengue virus. **protocols.io** <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.rm7vzbpxvx1/v1>

License: This is an open access protocol distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited

Protocol status: Working
 We use this protocol and it's working

Created: Apr 28, 2023

Last Modified: Jun 27, 2023

PROTOCOL integer ID:
 81150

Técnica de inmunofluorescencia indirecta para detección de dengue virus

Delia Piedad Recalde-Reyes¹,

Juliana Lopez Calderon²

¹Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt;

²Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt



Juliana Lopez Calderon

Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

ABSTRACT

La inmunofluorescencia indirecta (IFI) es una técnica para detectar la presencia de anticuerpos en una muestra. Esta se debe a la unión de anticuerpos fluorescentes a los anticuerpos presentes en la muestra, lo que permite la detección visual de estos.

Para la visualización, se aplican anticuerpos fluorescentes a un portaobjetos de vidrio que contiene una muestra fijada y se observa con un microscopio de fluorescencia.

Si hay anticuerpos en la muestra que se unen a los anticuerpos fluorescentes, se produce una fluorescencia indicando la presencia de anticuerpos.

Este protocolo fue desarrollado gracias al apoyo administrativo de la CUE Alexander von Humboldt de Armenia y desarrollado dentro de la convocatoria de Minciencia 917 de estancia en investigación: Desarrollo de una prueba tipo Western blot, Dot blot e Inmunofluorescencia para detección de antígenos virales de dengue serotipos 1 – 4.

GUIDELINES

El siguiente protocolo describe el paso a paso para la realización de una prueba tipo inmunofluorescencia indirecta para detección de dengue virus.

Tiempo de duración 24 horas a partir de la adición de las células eucariotas en las cajas de 24 pozos.

MATERIALS

Cajas de cultivo de 24 pozos
Microscopio de fluorescencia
Micropipetas 0,1-10; 10-100ul
Vidrios
Cabina de bioseguridad.
Centrífuga refrigerada.

Medio RPMI 1640 powder con L-glutamina sin bicarbonato Gibco.
Bicarbonato de sodio al 7,5% Gibco o Sigma (para cultivo celular)
Suero fetal bovino bajo en endotoxinas Gibco o Sigma.
Antibiótico antimicótico para cultivo celular 100X= Penicilina 10000 unidades/ml
streptomycin 10000unidades/mL.
Trypsina 0,25% con rojo fenol (o sin rojo fenol).
Medio de fijación: Formol al 4% disuelto en PBS 1X
PBS (Buffer fosfato salino) con tween al 0,05%

SAFETY WARNINGS

- ❗ Implementar todas las medidas de bioseguridad para trabajo en el laboratorio. Utilizar guantes, bata y cabina de bioseguridad tipo II, manejar todos los reactivos y suplementos de forma aséptica para garantizar cultivos axénicos libres de microorganismos. Utilizar alkazime para inactivar los desechos que se generen en el procedimiento tales como virus, células cancerígenas, aislados clínicos o cualquier otro biológico que cause daño a la salud.

BEFORE START INSTRUCTIONS

Cumplir con todas las medidas de bioseguridad. Preparar todos los medios y reactivos necesarios para usar en el inmunoensayo. Asegúrese de contar con la cantidad suficientes para cada uno de los pasos.

1 Mantenimiento línea celular BHK

Para obtener células BHK, se requiere


2 Se emplea una caja de 24 pozos para trabajar con células BHK (RPMI), se usará vidrio para cada uno de los pozos.

3 Se adiciona 100.000 células por cada uno de los pozos.



4 Infección viral de células eucariotas

2h


Se realiza la infección con virus dengue 2 (DENV 2) con un $Moi=1$, y se deja la interacción virus-célula durante  02:00:00 2 horas a  37 °C .

4.1 Pasado el tiempo, se retira el inóculo y se adiciona medio de mantenimiento  200 μ L .

1d




Se deja  Overnight en cámara húmeda a  37 °C .

5 Lavado

Al día siguiente, se realizan 2 a 3 lavados con  200 μ L de solución salina 0.9%.


6 Fijación

10m

Se hará fijación con  200 μ L paraformaldehído al 4%, se incuba a  4 °C durante  00:10:00 10 minutos , después se realizan 2 lavados con solución salina 0.9%.


7 NH₄Cl 50 milimolar disuelto en PBS o solución salina 1X  200 μ L durante

10m

 00:10:00 10 minutos (se elimina la fluorescencia inespecífica a temperatura ambiente.)

8 Permeabilización

15m

La permeabilización se realizará con tritón X100 al 0,5% disuelto en PBS o solución salina 1X,  200 μ L por pozo.

Se incuba durante  00:05:00 5 minutos a  37 °C . Posteriormente se realizan 2 lavados

con solución salina y se deja

00:10:00 10 minutos

Note

Se realiza permeabilización de 22 pozos y se dejan 2 pozos sin permeabilizar para establecer los controles.

9 Seguido se realizará bloqueo PBS O SSN 1X o leche descremada al 5% durante

45m

00:45:00 45 minutos

a 37 °C

Note

El bloqueo también podría realizarse con albumina

10 **Anticuerpo primario**

40m

Se adicionan los anticuerpos (ANTICUERPO PRIMARIO)

- Anti NS1 1:10.000 disuelto en PBS 1X

Se dejarán en interacción durante

00:40:00 40 minutos

a 37 °C. Después lavado 3

veces con PBS 1X se dejan 3 minutos cada lavado.

11 Finalmente se adicionaron los anticuerpos (ANTICUERPO PRIMARIO)

- Anti NS1 1:10.000 disuelto en PBS 1X
- Anti ENV 1:5.000 disuelto en PBS 1X

Anticuerpos de rato los cuales se dejarán en interacción durante 40 minutos a 37 grados. Después lavado 3 veces con PBS 1X se dejan 3 minutos cada lavado.

12 **ANTICUERPO SECUNDARIO**

1. Anticuerpo secundario anti-mouse, Fitc 1:200, se deja incubando media hora a 37 grados
2. Prepara ssn de Hoesht 1 uL en 1000 mL 1X PBS 5 minutos a 37 grados. 2 lavados con PBS 1 X
3. 50 um sobre láminaportaobjetos cada vidrio sobre la lámina. Se deja reposar 24 h.