

## X ANEXO

### **FLUXOGRAMA 1. PRODUCCION DE ANTIGENO LISADO**

Inocular 1ml de semilla viral en frascos de 250cm<sup>2</sup> que contienen la monocapa de células Vero de 3 a 4 días de cultivo



Observar y cosechar los frascos con efecto citopático de 2+ a 3+



Centrifugación del barrido de células en 10 000 rpm x 30min a 4°C



Lavado de células con buffer borato salino por centrifugación a 10 000rpm x 30min a 4°C (repetir tres veces esta operación)



Resuspender el pellet con borato salino en una relación de 1 a 1.5ml por frasco cosechado conteniendo 1% de triton 100X



Inactivar la suspensión con Tris 1M y  $\beta$ -propiolactona



Sonicar durante 15 segundos 3 veces (realizar este proceso en hielo)



Centrifugar en 5 000rpm x 30min a 4°C y alicuotar

## **FLUXOGRAMA 2. ELISA IgG INDIRECTA PARA PHLEBOTOMUS FEVER EN SUERO HUMANO**

Sensibilizar placas flexibles DINEX (fondo en U) con 100ul. de antígeno lisado diluido (1:1 000) en buffer PBS pH 7.4 y con 100ul. de control de antígeno diluido (1:500) en buffer PBS pH 7.4 en filas intercaladas. Incubar toda la noche a 4°C

*Lavar 5 veces con buffer de lavado*



Diluir los sueros a 1:100 en buffer diluyente (a partir de la predilución 1:10 con H-MEM) y agregar 100ul. a 4 pozos. Emplear un suero control positivo (100ul. a 2 pozos ) y tres controles negativos (100ul. a 2 pozos por control negativo).

Incubar a 37°C por 60 minutos.

*Lavar 5 veces con buffer de lavado*



Agregar 100ul. de conjugado anti-IgG humano diluido (1:8 000) en buffer diluyente e incubar a 37°C por 60 minutos.

*Lavar 5 veces con buffer de lavado*



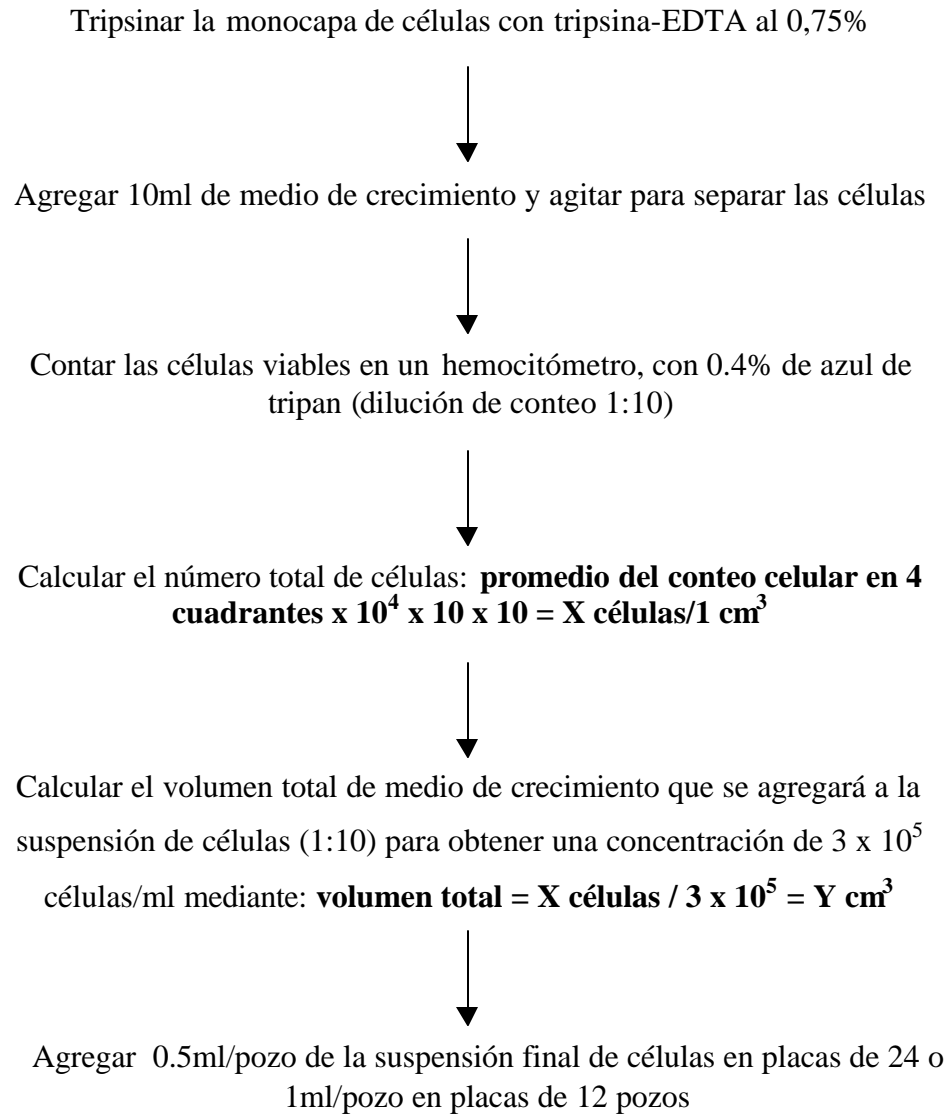
Adicionar 100ul. de sustrato ABTS e incubar a 37°C por 30 minutos



Leer a 410nm. e interpretar los resultados

**FLUXOGRAMA 3. PREPARACION DEL CULTIVO DE CELULAS BHK-**

**21 CLON 15 PARA PRNT**



**SOLUCIONES PREPARADAS EN EN LABORATORIO PARA EL ENSAYO DE ELISA IgG**

**1. BORATO SALINO (SOLUCION STOCK) :**

**Acido bórico 0.5M :**

|                                |           |
|--------------------------------|-----------|
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> | 30.92 g.  |
| Agua destilada caliente        | 700 ml.   |
| Agua destilada c.s.p.          | 1 000 ml. |

**Cloruro de sodio 1.5M :**

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| NaCl                  | 87.62 g.  |
| Agua destilada c.s.p. | 1 000 ml. |

**Borato salino a pH 9.0 :**

|                                     |           |
|-------------------------------------|-----------|
| NaCl 1.5M                           | 80 ml.    |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> 0.5M | 100 ml.   |
| NaOH 1N                             | 24 ml.    |
| Agua destilada c.s.p.               | 1 000 ml. |
| Regular el pH hasta 9.0             |           |

**2. BUFFER FOSFATO SALINO ( PBS 10X ) A pH 7.4 :**

|                                  |           |
|----------------------------------|-----------|
| NaCl                             | 80 g.     |
| KCl                              | 2 g.      |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>  | 1.4 g.    |
| Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> | 9.1 g.    |
| Agua destilada c.s.p.            | 1 000 ml. |

**3. BUFFER DE DILUCION :**

|                               |           |
|-------------------------------|-----------|
| PBS 10X                       | 100 ml.   |
| Leche descremada deshidratada | 50 g.     |
| Tween 20                      | 1 ml.     |
| Agua destilada c.s.p.         | 1 000 ml. |

**4. BUFFER DE LAVADO :**

|                       |           |
|-----------------------|-----------|
| PBS 10X               | 100 ml.   |
| Tween 20              | 1 ml.     |
| Agua destilada c.s.p. | 1 000 ml. |

**SOLUCIONES PREPARADAS EN EL LABORATORIO PARA LA  
PRUEBA DE NEUTRALIZACION POR REDUCCION EN PLACA  
(PRNT)**

**1. CARBOXIMETIL CELULOSA AL 3% (CMC) :**

CMC 3 g.

Agua destilada estéril c.sp. 100 ml.

Utilizar frasco estéril; mezclar con la ayuda de un magneto.

Autoclavar por 30 min.

Conservar a temperatura ambiente.

**2. MEDIO MINIMO ESENCIAL Eagle (10X) :**

E-MEM 10 g.

Agua destilada estéril c.s.p. 100 ml.

Mezclar y filtrar (esterilizar).

Conservar a 4°C.

### 3. LIQUID OVERLAYER MEDIUM :

|                            |         |
|----------------------------|---------|
| CMC 3%                     | 100 ml. |
| MEM (10X) sin rojo fenol   | 50 ml.  |
| FBS                        | 50 ml.  |
| L-glutamina                | 5 ml.   |
| Antibiotico                | 5 ml.   |
| NaHCO <sub>3</sub> al 7.5% | 5 ml.   |
| Agua destilada estéril     | 500 ml. |
| Conservar a 4°C.           |         |

### 4. COLOR STAIN :

|                                  |         |
|----------------------------------|---------|
| Azul naftol                      | 1 g.    |
| Acetato de sodio                 | 13.6 g. |
| Agua destilada                   | 940 ml. |
| Mezclar con magneto por 10 min.  |         |
| Acido acético glacial            | 60 ml.  |
| Mezclar por 30 min               |         |
| Mantener a temperatura ambiente. |         |

## FORMULAS UTILIZADAS

$$\text{SENSIBILIDAD: } \frac{\text{PV} + \text{PF}}{\text{PT}} \times 100$$

$$\text{ESPECIFICIDAD: } \frac{\text{NV} + \text{NF}}{\text{NT}} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO POSITIVO: } \frac{\text{PV}}{\text{PT}} \times 100$$

$$\text{VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: } \frac{\text{NV}}{\text{NT}} \times 100$$

PT: positivos totales

NT: negativos totales

PV: positivos verdaderos

NV: negativos verdaderos

PF: positivos falsos

NF: negativos falsos