

X ANEXO

FLUXOGRAMA 1. PRODUCCION DE ANTIGENO LISADO

Inocular 1ml de semilla viral en frascos de 250cm² 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 β-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



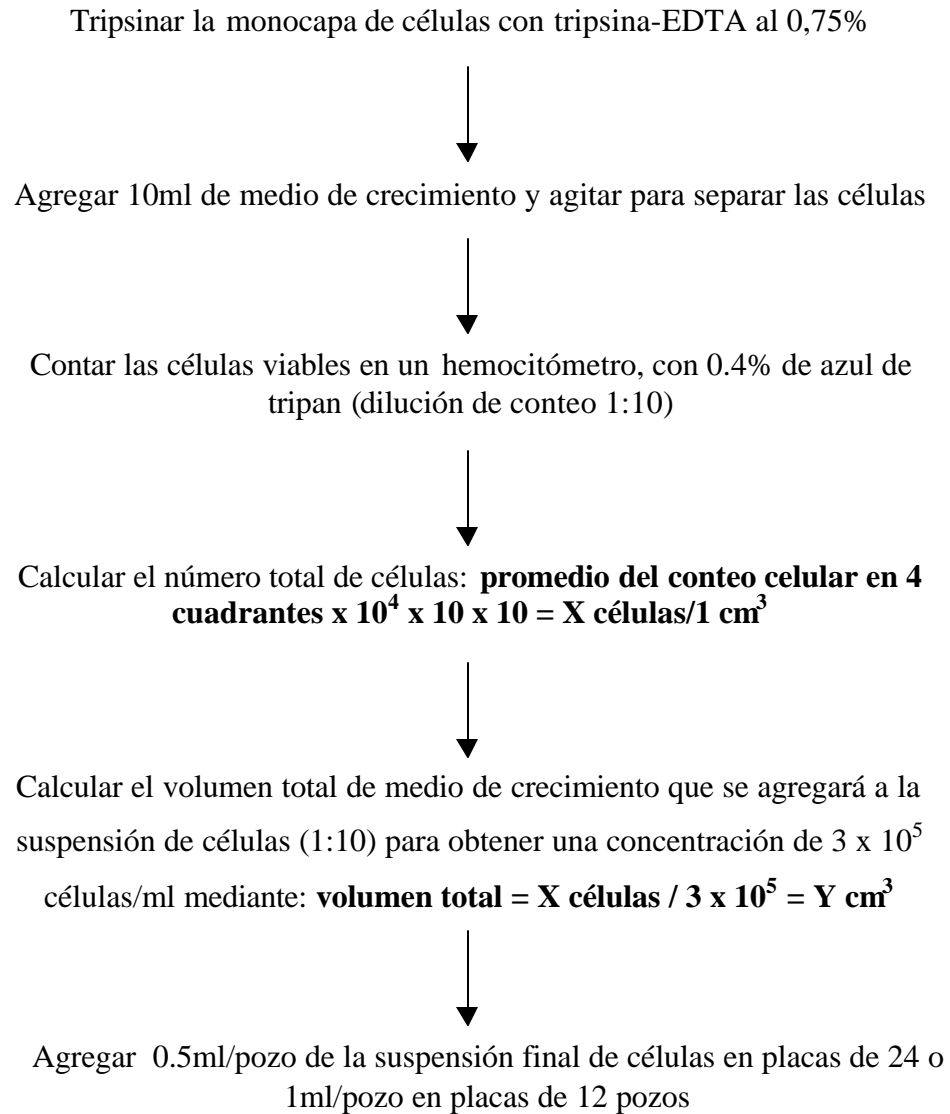
Adicionar 100ul. de sustrato ABTS e incubar a 37°C por 30 minutos



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 ₃ BO ₃	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 ₃ BO ₃ 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 ₂ PO ₄	1.4 g.
Na ₂ HPO ₄	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 ₃ 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

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

PT

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

NT

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

PT

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

NT

PT: positivos totales

NT: negativos totales

PV: positivos verdaderos

NV: negativos verdaderos

PF: positivos falsos

NF: negativos falsos