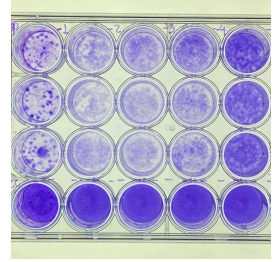


May 05, 2023

DENV 2 Infection

DOI

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwpbdl5r/v1>



Edwin Stiven Quiguanás¹, Delia Piedad Recalde-Reyes²

¹Universidad del Quindío; ²Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt



Edwin Stiven Quiguanás

Universidad del Quindío

Create & collaborate more with a free account

Edit and publish protocols, collaborate in communities, share insights through comments, and track progress with run records.

Create free account

OPEN  ACCESS



DOI: <https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwpbdl5r/v1>

Protocol Citation: Edwin Stiven Quiguanás, Delia Piedad Recalde-Reyes 2023. DENV 2 Infection . **protocols.io**

<https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.j8nlkwpbdl5r/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: March 28, 2023

Last Modified: May 05, 2023

Protocol Integer ID: 79497

Keywords: DENV. Infección. Plaqueo, infection

Funders Acknowledgements:

Molecular Immunology Group

Abstract

En este protocolo se describen las condiciones para el mantenimiento de las líneas celulares C6/36 HT y BHK-21, además del procedimiento de infección y plaqueo del DENV 2

Materials

Materiales

Tubos de 1,5 mL

Tubos de 2,0 mL

Tubos de 15 mL

Tubos de 50 mL

Crioviales

Cajas T25

Cajas T75

Microplacas de 24 pozos

Puntas de 10, 200 y 1000 uL con filtro

Reactivos

Medio de cultivo L-15

Medio de cultivo RPMI-1640

Antibiótico antimicótico

L-glutamina

Bicarbonato de sodio

Suero fetal bovino

Solución salina

Buffer PBS 1X

Amplificación del virus

- 1 La infección y amplificación del DENV 2 se realiza en células C6/36 (*Aedes albopictus* clone C6/36 CRL-1660™ ATCC) (línea celular originaria del mosquito *Aedes albopictus* y utilizadas para la replicación de Flavivirus). Esta línea celular es un clon obtenido de las líneas del mosquito *Aedes albopictus* de Singh (1967) que presenta una alta sensibilidad a los virus Dengue y Chikunguya. Se ha demostrado que estas células son más sensibles en comparación a otras líneas de mosquito como las AP61 y TRA-284.

Para el mantenimiento de esta línea celular se utiliza el medio de cultivo L-15 (Leibovitz's L-15 Medium con L-glutamina Marca Gibco Cat No. 41300-039 ×10-1L).

1.1 Preparación de medio L-15

Nota: este medio no contiene bicarbonato de sodio

Cada sobre contiene 13,7 gramos para preparar un Litro de medio

- En un recipiente de vidrio agregar 500 mL de agua estéril (agua de droguería) y agregar todo el contenido de un sobre de medio L-15. Disolver con ayuda de un agitador magnético.
- Una vez completamente disuelto el medio, adicional 500 mL de agua estéril y continuar agitando
- Ajustar el pH del medio a 7,6 con HCL si es necesario
- Esterilizar el medio por filtración

Preparación del medio de cultivo L-15 para crecimiento inicial de C6/36

Se preparan alícuotas de 50 mL suplementado con SFB 10 %

Tabla 1.

	A	B	C	D
	Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen
	L-15	1X	1X	43 mL
	SFB	100 %	10 %	5 mL
	L-glutamina Cat No: SH30034.02	200 mM	2 mM	500 uL



	A	B	C	D
	Antibiótico Sigma A5955-100 mL	100X	1X	500 uL
	Triptosa fosfato	4X	10 %	1,25 mL

Preparación del medio de cultivo L-15 para mantenimiento de C6/36

Se preparan alícuotas de 50 mL suplementado con SFB 2 %

Tabla 2.

	A	B	C	D
	Reactivo	Concentración Stock	Concentración final	Volumen
	L-15	1X	1X	47 mL
	SFB	100 %	2 %	1 mL
	L-glutamina	200 mM	2 mM	500 uL
	Antibiótico	100X	1X	500 uL
	Triptosa fosfato	4X	10 %	1,25 mL

Procedimiento para descongelación y apertura de línea celular C6/36

Previo a todo el procedimiento, limpiar la cabina de flujo laminar y dejar todo el material necesario en UV por 15 o 20 minutos.

- En un tubo falcon de 15 mL agregar 3 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10 % (Tabla 1).
- Sacar del freezer o del nitrógeno líquido el criovial de células C6/36, llevarlo a la cabina de flujo y descongelarlo suavemente con las manos.
- Una vez descongeladas las células, se adiciona al criovial 1 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10 %, mezclar por pipeteo muy suave y luego agregar todo el contenido al tubo de 15 mL. (Volumen final de 5 mL).
- Se centrifugan las células a 150 gravedades x 10 minutos y temperatura de 18 a 20 °C en centrifuga con rotor 143.

- Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet de células con 5 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 10 %.
- Transferir todo el contenido a una caja T25, rotularla con el nombre de la línea celular, número del pase, porcentaje de SFB y responsable.
- Incubar las células a 28 °C sin CO₂.

Procedimiento pase de células C6/36

- Previo a todo el procedimiento, atemperar los reactivos que se van a utilizar, en este caso, solución salina y el medio L-15 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.
- Se observan las células al microscopio, se revisa la morfología y la confluencia y se procede a realizar el pase.
- Se toma la caja T25 y se descarta el medio de cultivo, sin hacer movimientos muy bruscos. Luego realizar uno o dos lavados muy suaves con solución salina.
- Después de los lavados se le adiciona 5 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 2 %. Luego, se le da unos golpes muy suaves en seco por los costados de la caja con el fin de desprender las células (esta línea celular no requiere del uso de tripsina).
- Todo el contenido se transfiere a una caja T75 y luego se le adicionan 10 mL de medio L-15 suplementado con SFB al 2 % (Volumen final 15 mL).
- Si se desea, a la caja T25 se le adiciona nuevo medio L-15 y se sigue manteniendo.
- Las cajas se incuban a 28 °C

Procedimiento congelación de células C6/36

- Al tener una caja T25 o T75 con una confluencia del 90 al 100 % se procede a congelar las células para preservar la línea celular.
- Previo al procedimiento, se sacan los crioviales estériles, se rotulan con el nombre de la línea celular, número de pase, fecha y responsable.
- A cada criovial se le adicionan 100 uL de DMSO grado cultivo celular Ref D2650 Sigma-Aldrich
- Luego, se toma la caja y se dan golpes suaves por los costados con el fin de desprender las células. El contenido es transferido a un falcon de 15 mL.
- Se centrifugan las células a 800 rpm x 10 minutos
- Se descarta el sobrenadante y se resuspender el pellet en 1 mL de suero fetal bovino si el pellet es de una caja T25 o en 5 mL si el pellet es de una caja T75.
- A cada criovial con DMSO (concentración final 10 %) se le adicionan 900 uL de células, se mezcla suavemente y se guardan en freezer por una semana. Posteriormente, se pasan los crioviales a nitrógeno líquido.

Procedimiento infección de células C6/36 con DENV 2

El procedimiento de infección se hace en células C6/36 mantenidas en una caja de T75 y con una confluencia del 90 al 100 %.

- Se realiza un lavado muy suave con solución salina previamente atemperada.
- En un tubo falcon de 15 mL adicionar 8 mL de medio L-15 sin suplementos (este volumen es para infectar dos cajas T75).
- A esos 8 mL de medio se le adicionan 500 uL de DENV 2 (el virus previamente descongelado).
- Una vez se tiene la solución de medio + virus, se elimina la solución salina de la caja T75 y se adicionan 4,25 mL de la solución de virus.
- Se incuba la caja T75 a 28 °C por dos horas (verificar que la caja quede en posición recta en la incubadora y el medio cubra toda la superficie de la caja para evitar que las células se sequen y mueran).
- Cada 20 minutos revisar la caja y mezclar suavemente moviendo la caja.
- Mientras pasan las dos horas de infección realizar lo siguiente:
- En un tubo falcon de 15 mL, adicionar, 7120 uL de medio L-15 sin suplementos, 400 uL de triptosa fosfato al 4X, 320 uL de SFB puro y 160 uL de antibiótico (volumen final de 8 mL para dos cajas T75).
- Una vez suplementada esa alícuota de medio y pasadas las dos horas de infección, sin retirar el inóculo viral de la caja T75, adicionar 4 mL. Por lo tanto, la caja T75 queda con un volumen final de 8,25 mL.
- Se incuba la caja a 28 °C por 7 días.

Nota: a los 3 o 4 días de infección se pueden revisar las células y observar el efecto citopático

Finalización de la infección

- Después de los 7 días de infección, se saca la caja T75 de la incubadora y se observan las células al microscopio.
- Luego, el contenido de la caja es transferido a un tubo de 15 mL, dejando 1 mL en la caja.
- El contenido del falcon se centrifuga a 600 gravedades (2900 rpm) x 5 minutos a 4 °C.
- Se sacan alícuotas de 600 uL del sobrenadante en tubos de 1,5 mL, se rotulan y se guardan a -80 °C.
- La caja T75 con volumen final de 1 mL se congela a -80 °C por 24 horas.
- Pasadas las 24 horas, sacar todo el contenido y hacer alícuotas en tubos de 1,5 mL, rotularlos como "lisado célula.

Plaqueo de DENV 2 en células BHK-21

- 2 Esta línea celular BHK.21 se trabaja con medio RPMI-1640 referencia R6504 – 1L, este medio contiene L-glutamina y no contiene bicarbonato de sodio.

2.1 Preparación de medio RPMI-1640

Nota: este medio no contiene bicarbonato de sodio. Trabajarlo así

Cada frasco contiene los gramos necesarios para preparar un Litro de medio

- En un recipiente de vidrio agregar 500 mL de agua estéril (agua de droguería) y agregar todo el contenido del frasco. Disolver con ayuda de un agitador magnético.
- Una vez completamente disuelto el medio, adicional 500 mL de agua estéril y continuar agitando.
- Esterilizar el medio por filtración

El Procedimiento para descongelación y apertura de línea celular se realiza de la misma forma que se realizó para las células C6/36

Nota: Tener en cuenta que las células BHK-21 se incuban a 37 °C y 5 % de CO₂.

Procedimiento pase de células BHK-21

- Al tener una caja T25 con una confluencia del 90 al 100 % se procede a hacer un pase de células.
- Previo a todo el procedimiento, atemperar los reactivos que se van a utilizar, en este caso, solución salina, tripsina y medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.
- Luego, se toma la caja y se realizan dos lavados con 2 o 3 mL de solución salina.
- Después de los lavados, retirar muy bien la solución salina y adiciona 500 uL de tripsina previamente atemperada. Incubar por 1.30 o 2 minutos a 37 °C con el fin de desprender las células.
- Pasado ese tiempo, dar unos golpes muy suaves para terminar de desprender todas las células y adicionar 1 mL de SFB o 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB (con la concentración que se vaya a trabajar).
- El contenido (volumen de 1,5 mL) es transferido a un falcon de 15 mL.
- Se centrifugan las células a 800 rpm x 10 minutos
- Se descarta el sobrenadante y se resuspende el pellet en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.
- De una caja T25 se abren 3 cajas T25, para ello, adicionar 300 uL de las células resuspendidas a cada una de las nuevas T25 y adicionar 5 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 2 % o 5 % según sea el caso.

- Incubar las cajas a 37 °C y 5 % de CO₂.

Procedimiento congelación de células BHK-21

- Al tener una caja T25 con una confluencia del 90 al 100 % se procede a congelar las células para preservar la línea celular.
- Previo al procedimiento, se sacan los crioviales estériles, se rotulan con el nombre de la línea celular, número de pase, fecha y responsable.
- A cada criovial se le adicionan 100 uL de DMSO grado cultivo celular Ref D2650 Sigma-Aldrich
- Luego, se toma la caja y se realizan dos lavados con 2 o 3 mL de solución salina previamente atemperada.
- Después de los lavados, retirar muy bien la solución salina y adiciona 500 uL de tripsina previamente atemperada. Incubar por 1.30 o 2 minutos a 37 °C con el fin de desprender las células.
- Pasado ese tiempo, dar unos golpes muy suaves para terminar de desprender todas las células y adicionar 1 mL de SFB o 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB (con la concentración que se vaya a trabajar).
- El contenido (volumen de 1,5 mL) es transferido a un falcon de 15 mL.
- Se centrifugan las células a 800 rpm x 10 minutos.
- Se descarta el sobrenadante y se resuspender el pellet en 1 mL de suero fetal bovino.
- A cada criovial con DMSO (concentración final 10 %) se le adicionan 900 uL de células, se mezcla suavemente y se guardan en freezer por una semana. Posteriormente, se pasan los crioviales a nitrógeno líquido.

Procedimiento conteo de células BHK-21 para plaqueo

- De una caja T25 salen aproximadamente 2,5 a 3 millones de células. Por lo tanto, se tripsinizan las células BHK.21 bajo las mismas condiciones del procedimiento de pase de células.
- El pellet de células se resuspende en 1 mL de medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 5 %.
- Se toman 10 uL de las células y mezclan con 10 uL de azul tripán
- Se hace el conteo de las células en cámara de Neubauer. Realizar el conteo de las células de los 4 cuadrantes de la cámara

células totales: sumatoria de las células de los 4 cuadrantes

10.000: Dimensión de la cámara de Neubauer

2: Factor de dilución

4: # cuadrantes totales

$$\text{células/mL} = ((\# \text{ células totales} * 10.000) * 2) / 4$$

Se adicionan 400 uL de la solución de células a cada pozo de la placa de 24. A la placa, suavemente se le realizan movimientos en círculo o de arriba hacia abajo con el fin de extender las células en toda la superficie de cada pozo.

- Se observan las células al microscopio y luego se incuba la placa por 24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂.

Condiciones del plaqueo

Número de células/pozo: 90.000. Para una caja de 24 pozos se requieren 2.5 millones de células (un total para 28 pozos)

Medio RPMI-1640 suplementado con SFB al 5 %

Volumen/pozo: 400 uL

Volumen final de solución de células: 11.200 uL (11 mL + 200 uL)

Preparación de carboximetilcelulosa al 3 % (CMC)

Se utiliza la carboximetilcelulosa Ref C4888 viscosidad media de SIGMA-ALDRICH

Se prepara un volumen final de 500 mL de carboximetilcelulosa a concentración del 3 %, para ello:

- Pesar 15 gramos de CMC y aforar a 500 mL (se usan 3 gramos por cada 100 mL).
- Dejar la mezcla disolviéndose por 24 horas
- Posterior a las 24 horas, se esteriliza por autoclave
- Sacar alícuotas en tubos de Falcon de 50 mL

Preparación del medio overlay

Nota: Este medio se prepara en el espacio de dos horas que hay durante infección.

RPMI-1640 Ref R6504 (con L-glutamina) (No bicarbonato de sodio).

Para una sola placa de 24 pozos, se prepara una alícuota de 25 mL

Tabla 3.

	A	B	C
	Reactivo	Volumen	Concentración final
	RMPI-1640 al 2X	13,5 mL	1X
	CMC al 3 %	10 mL	1,2 %
	Antibiótico	250 uL	1X
	Bicarbonato de sodio	500 uL	
	Suero fetal bovino puro	500 uL	2 %

Procedimiento de plaqueo DENV 2

Nota: previo al procedimiento, limpiar la cabina de flujo laminar con alcohol al 70 % y dejar en UV por 15 minutos.

Pasadas las 24 horas de incubación de las células en la placa de 24 pozos, se observan al microscopio y se analiza la confluencia.

- Se descarta todo el contenido de medio de los pozos de la caja de 24.
- Se realizan dos lavados con 200 uL de solución salina por pozo (solución salina previamente atemperada).
- En el último lavado, se retira la solución salina de los pozos:

A2 hasta A6

B2 hasta B6

C2 hasta C6

- Una vez retirada la solución salina de los pozos mencionados, se adiciona en cada pozo 200 uL de **medio RPMI-1640 sin suplementos** (agregar suavemente por la pared de cada pozo).
- Finalizada esta parte, se retira la solución salina de todos los pozos de la fila D y se les adiciona 200 uL de medio RPMI-1640 sin suplementos (A estos pozos ya no se les hace nada durante el resto del procedimiento). Estos serán los controles de células.
- Una vez realizados estos pasos, continuar con:

- Retirar la solución salina de los pozos de la columna 1 (1A – 1B – 1C) y adicionar 200 uL en cada pozo del virus DENV 2 puro. Mezclar suavemente haciendo giros a la placa.

Diluciones del virus

En este paso, las diluciones del virus se realizan directamente en cada uno de los pozos.

- Los pozos de la columna 1, cada uno tiene 200 uL de virus puro.
- Luego, se inclina un poco la placa y se toman 20 uL de cada uno de los pozos de la columna 1 (1A – 1B – 1C) y se adicionan a cada pozo de la columna 2 (2A – 2B – 2C) y así sucesivamente hasta llegar la columna 6.

Nota: En cada dilución, mezclar la misma cantidad de veces antes de continuar con la siguiente dilución (se mezclaron 5 veces).

- Una vez se termina de realizar las diluciones, se mezcla suavemente haciendo giros de arriba abajo y de izquierda a derecha.
- La caja de 24 se incuba a 37 °C con 5 % de CO₂ por 2 horas.
- Paso opcional: Cada 20 minutos, mezclar haciendo giros suaves a la placa

Diseño de la placa - Montaje del ensayo

	A	B	C	D	E	F	G
		1	2	3	4	5	6
	DENV 2	Puro	-1	-2	-3	-4	-5
	A	200					
	B	200					
	C	200					
	D	CC	CC	CC	CC	CC	CC

Fila D: Controles de células

Volumen final de infección: 200 uL

Tiempo de incubación: 2 horas a 37 °C y 5 % de CO₂

Después de finalizar la infección. Proceso final del plaqueo

- Pasadas las 2 horas de la infección, se saca la placa de la incubadora y se retira todo el medio de cada uno de los pozos.
- De manera ágil y rápida, sin dejar que se sequen las células de los pozos, se adiciona 1 mL de medio overlay previamente preparado y atemperado a 37 °C. (Adicionar suavemente por la pared de cada pozo).
- Una vez finalizado este proceso, se tapa la caja y se deja en cámara húmeda e incubar a 37 °C, 5 % de CO₂ por 8 días.
- Después de los 8 días de incubación, sacar la placa de 24 y observar las células al microscopio.
- Se descarta todo el medio overlay y se realizan 2 lavados con 400 uL de PBS 1X, agregando suavemente por las paredes de cada pozo.
- Luego, se fijan las células con 300 uL de formaldehído al 4 % (diluido en PBS 1X) por 30 minutos.
- Pasado este tiempo, se descarta el formaldehído.
- Se tiñen las células con 300 uL de cristal violeta previamente filtrado Ref 12214 (Químicos ALBOR LTDA) por 30 minutos y luego se lava la placa con agua de grifo retirando muy bien el exceso de colorante. No dejar caer el chorro del agua directamente en los pozos.

Resultados e interpretación

3

Interpretación

- Se observa la destrucción de la monocapa celular a causa del virus puro (columna 1).
- Se observan unidades formadoras de placa (UFP) en todas las diluciones (-1 a - 5).
- En la última dilución donde sean contables las UFP, se calcula el título del virus.