

Jun 27, 2023

# Técnica de inmunofluorescencia indirecta para detección de dengue virus

DOI

[dx.doi.org/10.17504/protocols.io.rm7vzbpxvx1/v1](https://dx.doi.org/10.17504/protocols.io.rm7vzbpxvx1/v1)



Delia Piedad Recalde-Reyes<sup>1</sup>, Juliana Lopez Calderon<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Corporación Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt;

<sup>2</sup>Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt



**Juliana Lopez Calderon**

Corporacion Universitaria Empresarial Alexander von Humboldt

## 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.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:** April 28, 2023

**Last Modified:** June 27, 2023

**Protocol Integer ID:** 81150

**Keywords:** los anticuerpos fluorescente, una fluorescencia indicando la presencia, de dengue serotipo, los anticuerpos presente, anticuerpo, si hay anticuerpo, aplican anticuerpo, es una técnica para detectar la presencia, unión de anticuerpo, dengue, virus

**Funders Acknowledgements:**

**Minciencias Convocatoria 917 de 2022**

**Grant ID:** convocatoria 917 de 2022 Minciencias

## 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 streptomicina 10000unidades/mL.

Tripsina 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%

## Troubleshooting

## 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

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  $\text{Moi}=1$ , 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  $\mu\text{L}$  .

1d

Se deja Overnight en cámara húmeda a 37 °C .

## 5 Lavado

Al día siguiente, se realizan 2 a 3 lavados con 200  $\mu\text{L}$  de solución salina 0.9%.

## 6 Fijación

10m

Se hará fijación con 200  $\mu\text{L}$  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  $\text{NH}_4\text{Cl}$  50 milimolar disuelto en PBS o solución salina 1X 200  $\mu\text{L}$  durante 00:10:00 10 minutos (se elimina la fluorescencia inespecífica a temperatura ambiente.)




10m

## 8 Permeabilización

15m





La permeabilización se realizará con tritón X100 al 0,5% disuelto en PBS o solución salina 1X,  200 µL 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

 00:45:00 45 minutos a  37 °C .

45m

#### 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 ssu de Hoesht 1 uL en 1000 mL 1X PBS 5 minutos a 37 grados. 2 lavados con PBS 1 X

3.50 um sobre lámina portaobjetos cada vidrio sobre la lámina. Se deja reposar 24 h.