

Universidad Autónoma del Estado de México
Centro Universitario UAEM Amecameca
Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia



Manual de Prácticas *Inmunología*

Elaboró: Dra. Cert Virginia Guadalupe García Rubio
MVZ José Juan Lira Amaya

Fecha: Enero/2020

Fecha de
aprobación

H. Consejo Académico

25/09/2020

H. Consejo de Gobierno

30/09/2020



ÍNDICE

I. Datos de identificación	3
II. Presentación	4
III. Lineamientos de seguridad e higiene para el uso del Laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro Universitario UAEM Amecameca	4
IV. Normas de seguridad	8
V. Sistema de evaluación	8
VI. Organización y desarrollo de las prácticas	
Práctica 1 Manejo de animales de laboratorio: Vías de inoculación y toma de muestras sanguíneas	9
Práctica 2 Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas	14
Práctica 3 Identificación de células del sistema inmune	18
Práctica 4 Diluciones	22
Práctica 5 Prueba de tuberculina	25
Práctica 6 Proyecto semestral: Elaboración del producto biológico inmunizante	31
Práctica 7 Proyecto semestral: Uso apropiado del producto biológico inmunizante	38
Práctica 8 Calostrometría	43
Práctica 9 Prueba de aglutinación	47
Práctica 10 Visita externa al Centro Nacional de Investigación Interdisciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP	50
Práctica 11 Proyecto semestral: Evaluación de la respuesta inmune	54
VII. Referencias Bibliográficas	59



I. Datos de Identificación

Espacio educativo donde se imparte

Centro Universitario UAEM Amecameca

Licenciatura

Licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia

Unidad de Aprendizaje

Inmunología

Clave

L43865

Carga académica

3

Horas teóricas

3

Horas prácticas

6

Total de horas

9

Créditos

Periodo escolar en que se ubica

1

2

3

4

5

6

7

8

9

Seriación

Microbiología

UA Antecedente

Ninguna

UA Consecuente

Tipo de Unidad de Aprendizaje

Curso

Curso-Taller

Seminario

Taller

Laboratorio

Práctica Profesional

Laboratorio

Práctica Profesional

Otro tipo (especificar)

Modalidad educativa

Escolarizada. Sistema rígido

No escolarizada. Sistema virtual

Escolarizada. Sistema flexible

No escolarizada. Sistema a distancia

No escolarizada. Sistema abierto

Mixta (especificar)

Formación común

Formación equivalente

Unidad de Aprendizaje



II. Presentación

El programa de prácticas de la unidad de aprendizaje inmunología, está diseñado de acuerdo con los objetivos de aprendizaje y los contenidos establecidos en el plan de estudios de la licenciatura en Medicina Veterinaria y Zootecnia. La inmunología veterinaria comprende una gran cantidad de técnicas de laboratorio que radican en el diagnóstico inmunológico de enfermedades para el cuidado (prevención de enfermedades) y mejoramiento de la salud animal.

Las prácticas de laboratorio constituyen las actividades que permiten al alumno adquirir y desarrollar habilidades que vinculan a la inmunología con el entorno del Médico Veterinario Zootecnista.

El objetivo del presente manual es que el alumno sea capaz de diferenciar los componentes del sistema inmunológico y los mecanismos de la respuesta inmune ante la exposición de antígenos, para evaluar el estado inmune del individuo o la población, mediante técnicas de diagnóstico que permitan el diseño de medidas de prevención y control de las enfermedades. El presente manual constituye una guía facilitadora tanto para el estudiante como para el docente en la realización de las prácticas en el laboratorio y en la posta zootécnica.

III. Lineamientos de seguridad e higiene para el uso del laboratorio de Medicina Veterinaria y Zootecnia del Centro Universitario UAEM Amecameca

Los presentes lineamientos son aplicables a los alumnos que utilizan el laboratorio, con la finalidad de que las actividades prácticas se desarrollen con responsabilidad, fortaleciendo sus conocimientos en cuanto al manejo seguro de sustancias químicas que podrían afectar su salud, además de la prevención de accidentes.

DEL PERSONAL

1. El uso de bata blanca dentro del Laboratorio es personal, así como obligatorio, la cual para que cumpla su función es recomendable que sea de manga larga, preferentemente de algodón, mantenerla abotonada y limpia, ya que protege tu cuerpo y la vestimenta incluyendo suéteres y chamarras.
2. De acuerdo con las actividades a desarrollar, es requisito indispensable para todas las personas que trabajan dentro del laboratorio utilizar el equipo de protección personal (EPP) que incluye bata, guantes, cofia, cubre bocas, anteojos o lentes de seguridad, zapatos cerrados y algunos otros elementos que resguarden su integridad física.



3. Es importante que al ingresar al laboratorio si cuentas con cabello largo deberá ser perfectamente amarrado y sujetado dejando libre el rostro, para evitar accidentes, absteniéndose de la utilización de gorras sport o sombrero.
4. Por razones de seguridad e higiene está prohibido fumar dentro y cerca del laboratorio.
5. Como medidas necesarias para cuidar tu salud dentro del laboratorio: a) Está prohibido comer y beber cualquier tipo de alimento, por mencionar algunos: agua, jugos, chicles, pastillas, paletas o galletas, etc. b) Está prohibido peinarse y/o maquillarse dentro del laboratorio, así como el uso de uñas largas y pintadas, el uso de anillos, aretes largos, brazaletes y collares. c) Lavarse las manos cuidadosamente antes y después de cualquier manipulación. Así como antes de retirarse del laboratorio. d) Nunca inhalar, probar u oler directamente productos químicos cuando se desconocen las características de los mismos. e) Nunca pipetear con la boca, es mejor utilizar las perillas de seguridad o pro pipetas. f) Por seguridad, queda prohibido el uso de lentes de contacto cuando se ingresa al laboratorio. En caso de ser necesarios utilizar lentes de protección adicionales, e informar al docente o al responsable de laboratorio del uso de los mismos. g) Queda restringido el acceso a laboratorio, con ropa tales como: pantalones cortos, shorts, o minifaldas y zapato abierto. h) Es importante retirar la bata, hasta que te encuentres fuera del área de laboratorio.
6. Identificar y localizar los dispositivos de seguridad más cercanos a tu área de trabajo, tales como: extintores, lavajojos, regaderas, salidas de emergencia, entre otros.
7. Es necesario tener sumo cuidado en el manejo de tejidos o fluidos animales. Evitar heridas accidentales con instrumentos que puedan estar contaminados, así como ser cuidadoso con heridas abiertas, aunque sean pequeñas, las cuales deberán estar cubiertas al ingresar al laboratorio.
8. Para evitar accidentes es fundamental trabajar con orden y limpieza, por ello las mesas, vitrinas extractoras y áreas de trabajo deberán estar limpias y únicamente con el material que la práctica requiere, dejándola libre de objetos y cosas innecesarias.
9. Mantener los pasillos despejados de mochilas, bolsas o cualquier objeto que pueda obstruir el paso rápido en caso de emergencia, por tanto, todo deberá ser guardado en la papelera debajo de la mesa de trabajo o en el estante asignado.
10. Por seguridad y respeto a los profesores y compañeros es obligatorio apagar teléfonos celulares antes de entrar a la práctica, así mismo queda prohibido conectar los celulares para su recarga en horas de laboratorio.



11. Queda restringido el uso de computadoras portátiles dentro del laboratorio en horas de prácticas.

DE LA PRÁCTICA

12. Antes de entrar a la sesión en el laboratorio es importante leer con detenimiento la práctica que se va a realizar, la cual está indicada en el manual de prácticas de la unidad de aprendizaje correspondiente.
13. Las operaciones que se realizan en algunas prácticas requieren información específica de seguridad por lo que es importante conocerla y solicitarla al docente y al coordinador de laboratorio, mismas que deberán estar escritas en el manual de prácticas de laboratorio de la unidad de aprendizaje correspondiente. En caso de duda en algún procedimiento, es mejor consultar con el docente, antes de proceder.
14. Leer las etiquetas de seguridad de los reactivos que se van a usar en la práctica; los frascos de reactivos contienen pictogramas y frases que informan su peligrosidad, uso correcto y las medidas a realizar en caso de ingestión, inhalación, etc. Algunos aparatos pueden contener información del mismo tipo. Leer detalladamente esta información y especificaciones son de ayuda para garantizar tu seguridad.
15. Para el manejo de sustancias químicas utilizar los implementos necesarios (pipetas, perillas, espátula por reactivo, pesar en vidrio de reloj y solo la cantidad necesaria, evitando regresar los sobrantes al envase original ya que se contamina.
16. En caso de accidente o derrame de algún reactivo o sustancia química reportar inmediatamente al docente o coordinador del laboratorio y seguir instrucciones de primeros auxilios o de limpieza.
17. Nunca utilizar ni limpiar ningún frasco de reactivos que haya perdido su etiqueta, se deberá entregar inmediatamente al docente o encargado del laboratorio.
18. Nunca sustituir un producto químico por otro en un experimento, a menos que la autorice el docente o responsable de laboratorio.
19. Evitar el uso de equipos o aparatos sin conocer perfectamente su funcionamiento, en caso de duda, preguntar al docente y/o Coordinador del Laboratorio.
20. Para el desecho de los residuos o productos de la práctica, seguir las instrucciones del docente o del coordinador de laboratorio, ya que por disposición oficial (art. 151 L.G.E.E.P.A.) queda prohibido desechar soluciones contaminantes o reactivos en la tarja y/o en botes de basura diferentes a los autorizados o etiquetados para desechos peligrosos.



21. Cuando se trabaje con muestras biológicas, no se deberá abandonar el lugar de trabajo ni pasear por el laboratorio o los pasillos con los guantes puestos ni tocar con ellos objetos de uso común (teléfono, computadoras, cerraduras, etc.).
22. Para prevenir accidentes por cortes y quemaduras de vidrios en el laboratorio, se recomienda: a) Nunca forzar un tubo de vidrio porque su ruptura puede originar cortaduras graves. Para insertar tubos de vidrio en tapones, primero se tiene que humedecer el tubo o agujero con agua o silicona. b) El vidrio caliente dejarlo por separado sobre una placa de madera o lienzos de tela para que se enfríe, para evitar accidentes o quemaduras es recomendable utilizar pinzas o tenazas. c) Nunca utilizar equipo de vidrio agrietado o roto, en caso de romper algún material vidrio depositar los restos del mismo en un contenedor proporcionado por el encargado de laboratorio.
23. Al término de la práctica el alumno dejará limpia y seca su área de trabajo, asegurándose que las llaves de agua y de gas queden debidamente cerradas.

PRÉSTAMO DE MATERIAL

24. El material y equipo de laboratorio necesario para la práctica que se realizará, se solicita mediante el formato "Vale de préstamo de material para realización de prácticas en la Licenciatura de M.V.Z" F001, y solo se aceptara la credencial institucional vigente que lo acredite como alumno de la institución (quedan sin validez cualquier otro tipo de credencial diferente a la solicitada).
25. En presencia del encargado de laboratorio, el alumno al recibir el material, verificará que se encuentre limpio y en buen estado. Si en el transcurso de la práctica se deteriora algún material y/o equipo el representante de equipo deberá informar inmediatamente al docente y/o encargado de laboratorio.
26. En caso de romper algún material o descomponer algún equipo del laboratorio, llenar el formato "Vale de recuperación de material M.V.Z" F003 (de manera individual o por equipo, según sea el caso) quedará retenida la credencial del o los alumnos participantes en el evento hasta el momento en que sea reparado el daño, tendrá vigencia de una semana la entrega del material dañado, de no ser así la cantidad de material adeudado se duplicará por cada semana de retraso.
27. Una vez que ha dado inicio la práctica, el alumno deberá permanecer dentro del laboratorio hasta que la práctica concluya, quedando restringidas las visitas y salidas constantes del laboratorio.
28. El alumno es responsable de objetos personales o de valor y deberá resguardarlos evitando dejarlos a la vista o sobre las mesas de trabajo.



IV. Normas de seguridad

1. Lavarse las manos con jabón cuantas veces sea necesario e incluso se puede utilizar algún antiséptico y si la práctica lo requiere, se utilizarán guantes.
2. Se utilizará una bata de tela gruesa, de manga larga, con el largo a la rodilla, perfectamente cerrada. La bata deberá quitarse antes de abandonar el laboratorio y guardarse inmediatamente.
3. Se utilizarán lentes de seguridad o máscaras cuando se trasvasan cantidades apreciables de líquidos corrosivos para evitar salpicaduras que pueden producir lesiones. Cuando se requiera el manejo de algún líquido corrosivo se buscará la posibilidad de trabajar dentro de una campana para extracción de gases utilizando máscaras de protección.
4. No se aspirará ningún tipo de líquido con la boca, ni tampoco deberán introducirse a la boca lápices o plumas que se dejan en cualquier lugar, no fumar, no ingerir o beber sustancias tóxicas en vasos mal lavados o contaminados.

V. Sistema de evaluación

La calificación de la parte práctica de la unidad de aprendizaje corresponde al 30% de la evaluación total del curso, de este porcentaje:

Lectura previa del protocolo	10%
Desarrollo de la práctica	10%
Reporte de prácticas	10%
Total	30%



VI. Organización y desarrollo de las prácticas

Práctica 1

Manejo de animales de laboratorio: vías de inoculación y toma de muestras sanguíneas

Introducción

En la investigación y la docencia es común la utilización de animales de laboratorio. Se define como animal de laboratorio a todo aquel ser vivo no humano, vertebrado o invertebrado, usado para la experimentación y otros fines científicos. Entre los animales de laboratorio más frecuentemente utilizados se encuentran los ratones, ratas, hámsteres, gerbos, conejos y aves. Sin embargo, cualquier especie animal utilizada con fines de experimentación puede considerarse como un animal de laboratorio; por ejemplo, cuando grandes especies de animales domésticos (caballos, cerdos, bovinos, etc.) son empleados para evaluar la eficacia de algunos productos químicos, o también para conocer sus necesidades nutricionales, estamos haciendo en realidad, un trabajo de investigación con animales de laboratorio.

Los animales de laboratorio para experimentación sirven como un modelo para sustituir al humano o a otras especies animales cuando por razones prácticas, económicas o morales, la investigación no puede llevarse a cabo directamente en la especie que queremos estudiar. El uso de los animales de laboratorio es un privilegio que debemos recordar al utilizarlos, tomando en cuenta que son seres vivos y que estamos obligados a darles un trato humanitario.

Vías de inoculación	Toma de muestras sanguíneas
<ul style="list-style-type: none">• Intramuscular (i.m.)• Subcutánea (s.c.)• Intraperitoneal (i.p.)• Intradérmica (i.d.)	<ul style="list-style-type: none">• Intracardiaca• Intravenosa<ul style="list-style-type: none">▪ Vena yugular▪ Vena caudal▪ Vena auricular marginal▪ Plexo retro-orbital

Manejo de animales de laboratorio para:

Transportar

Ratón: Para transferir a un ratón de un lugar a otro cercano (de una jaula a otra), deberá sujetarlo de la base de la cola, utilizando guantes.



Conejo: Para la transportación de un conejo se deben utilizar las dos manos (nunca cargue a un conejo sujetándolo de las orejas). Se toma la piel laxa del dorso con una mano y con la otra mano soportar el peso del animal tomándolo por detrás de los miembros posteriores (región sacra).

Gallina: Para transportar a un ave se le puede sujetar teniendo al animal con la cabeza de frente al operador poniendo la palma de la mano en la quilla con los dedos dirigidos hacia la cola y sujetando a continuación las patas y las alas (ayudándose con la otra mano) entre los dedos pulgar e índice, anular y meñique.

Inmovilizar

Ratón: Se coloca el ratón sobre una superficie donde este se pueda agarrar con las uñas (por ejemplo, la bata del operador), después el ratón debe ser sujetado de la punta de la cola con los dedos índice y pulgar de la mano izquierda, enseguida con el dedo meñique de la mano derecha se sujeta de la base de la cola realizando una pinza y con los dedos pulgar e índice de la misma mano se toma firmemente la piel del dorso y cuello lo más cercano a las orejas para inmovilizarlo.

Conejo: Para la inmovilización se coloca el conejo sobre la mesa de trabajo presionando el cuerpo con el antebrazo derecho del operador, después se debe colocar el dedo medio entre las orejas sujetando el miembro anterior derecho con los dedos índice y pulgar, y el miembro anterior izquierdo con el anular y el meñique, enseguida se levante el conejo y con la mano izquierda se sujetan por detrás los miembros posteriores, a continuación se gira el conejo tomando como eje el antebrazo derecho del operador hasta que el conejo quede en una posición decúbito dorsal.

Gallina: Para sujetarla y tomar las muestras sanguíneas del corazón, con una mano fijar las alas dirigiéndolas hacia el dorso del animal y con la otra mano sujetar los miembros. Colocar al ave sobre la mesa de forma que el lado derecho de la pared del tórax quede sobre la mesa.

Propósito de la práctica

El alumno aprenderá a manejar adecuadamente animales de laboratorio, y además practicará las principales vías para inoculación y toma de muestras sanguíneas.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas



Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata		
Material por equipo	Reactivos	Equipo
1 conejo 1 ratón 1 ave Torundas con alcohol al 70% 3 Jeringas de tuberculina estériles 3 Jeringas de 5 ml estériles con aguja 21 G X 32 mm 5 Tubos al vacío sin anticoagulante		1 Estetoscopio
Material por solicitar por grupo	Reactivos	Equipo
3 Tubos capilares para microhematocrito	1 frasco con solución salina fisiológica	

Desarrollo metodológico de la práctica

Inoculación:

1. Inmovilizar correctamente al animal (ratón y conejo) con apego a las normas éticas y de bienestar animal.
2. Elija dos vías de inoculación (i.m., s.c., i.p. o i.d.) y luego realice antisepsia con alcohol al 70% en la zona.
3. Con ayuda de una jeringa inocule 1 ml (conejo) y 0.2 ml (ratón) de solución salina fisiológica por cada una de las vías.

Toma de muestras sanguíneas:

Ratón:

4. Inmovilizar correctamente al animal con apego a las normas éticas y de bienestar animal.
5. Con ayuda de un tubo capilar para microhematocrito realice la punción del plexo retro-orbital en un ángulo de 30-45° tomando como referencia el plano de la nariz.
6. Depositar la sangre extraída en un tubo al vacío sin anticoagulante.

Conejo (punción de la vena auricular marginal):

7. Inmovilizar correctamente al animal con apego a las normas éticas y de bienestar animal.



8. Realizar antisepsia con alcohol 70% en la zona de la vena auricular marginal.
9. Utilizando una jeringa de tuberculina realizar la punción de la vena en un ángulo menor a 20° tomando como referencia el plano de la oreja y extraer suavemente la sangre.
10. Depositar la sangre extraída con la jeringa en un tubo al vacío sin anticoagulante.

Conejo (punción intracardiaca):

11. Inmovilizar correctamente al animal con apego a las normas éticas y de bienestar animal.
12. Realizar antisepsia con alcohol 70% en la zona torácica.
13. Escuchar los latidos cardiacos con el estetoscopio.
14. Utilizando una jeringa de 5 ml con aguja 21 G X 32 mm realizar la punción intracardiaca sobre el tercer y cuarto espacio intercostal en un ángulo 45° tomando como referencia el plano del esternón y extraer suavemente la sangre.
15. Depositar la sangre extraída con la jeringa en un tubo al vacío sin anticoagulante.

Ave (punción de la vena radial del ala):

16. Inmovilizar correctamente al animal con apego a las normas éticas y de bienestar animal.
17. Extender el ala y realizar antisepsia con alcohol 70% en la zona.
18. Una vez identificada la vena radial realizar la punción utilizando una jeringa de tuberculina, colocar la aguja paralelamente a la vena y extraer suavemente la sangre.
19. Depositar la sangre extraída con la jeringa en un tubo al vacío sin anticoagulante.

Resultados

Indique si hubo algún cambio en los sitios donde realizo la inoculación.

Indique los cambios que sufrió la sangre después de depositarle en el tubo sin anticoagulante.

Disposición de residuos

Las jeringas y agujas se depositarán en los contenedores para RRBI asignados por el responsable del laboratorio.

Las torundas impregnadas con sangre se esterilizarán para su desecho en la basura.



Actividad de integración o cuestionario

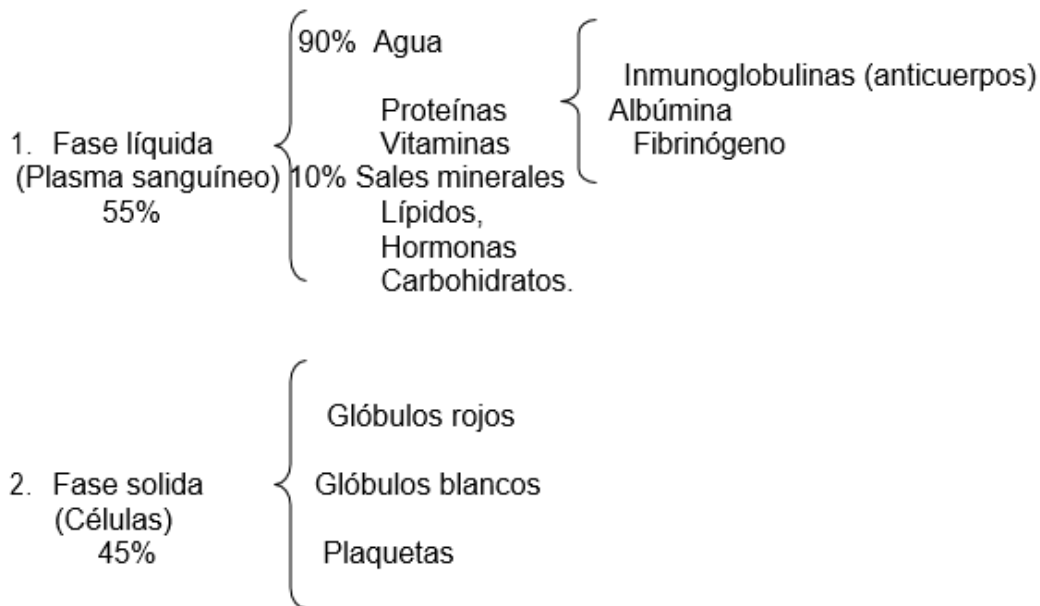
1. ¿Qué es un bioterio?
2. ¿Cómo se clasifican los animales de laboratorio según la presencia o ausencia de microorganismos?



Práctica 2 Obtención y procesamiento de muestras sanguíneas

Introducción

La sangre es un tejido que circula y se distribuye a través de las venas y arterias en todos los vertebrados. Es un tipo de tejido conjuntivo especializado, con una matriz coloidal líquida y una constitución compleja. Tiene una fase líquida representada por el plasma sanguíneo y una fase sólida compuesta por células, que incluye glóbulos rojos (o eritrocitos), glóbulos blancos (o leucocitos) y plaquetas.



En la actualidad no se entiende la producción y sanidad animal sin el uso de pruebas complementarias para el diagnóstico. Para ello, la selección apropiada, la toma oportuna y las condiciones de conservación y transporte de las muestras sanguíneas para el análisis en el laboratorio, son aspectos de importancia fundamental para obtener resultados confiables y precisos.

Dependiendo el tipo de prueba complementaria a realizar (directa o indirecta) y del tipo de muestra que se desea obtener (sangre completa, plasma sanguíneo, glóbulos rojos, glóbulos rojos o suero) se emplearan tubos al vacío con o sin anticoagulante. Los anticoagulantes más comúnmente utilizados son la heparina, EDTA, y citrato de sodio.



Para la obtención de suero, la muestra sanguínea deber ser tomada con tubos al vacío sin anticoagulante. Mientras que, para sangre completa la muestra debe tomarse con tubos al vacío con anticoagulante. Para la obtención de glóbulos rojos, glóbulos blancos y plasma, la sangre completa mezclada con el anticoagulante se centrifuga y se separan cuidadosamente. El suero y plasma se utilizan para la detección de inmunoglobulinas a través de las pruebas indirectas o serológicas que se utilizan en el laboratorio de inmunología, por ejemplo, el ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) y la prueba inmunofluorescencia indirecta (IFI). La obtención de los glóbulos rojos se realiza con la finalidad de usarlos como reactivos en otras pruebas utilizadas en inmunología como fijación del complemento o hemoaglutinación pasiva y los glóbulos blancos para visualizar cuerpos de inclusión compatibles con Ehrlichia canis y Anaplasma por medio del examen microscópico.

Propósito de la práctica

El alumno aplicará las bases teóricas para determinar cómo se debe tomar una muestra sanguínea de un bovino para la obtención de suero en el laboratorio de inmunología.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Overol Botas de hule Bata		
Material por equipo	Reactivos	Equipo
Torundas con alcohol al 70% 10 Agujas vacutainer 21 G X 38 mm 1 Soporte para agujas vacutainer 5 Tubos al vacío sin anticoagulante 5 Tubos al vacío con anticoagulante 1 Marcadores indelebles 3 lazos		
Material por grupo	Reactivos	Equipo
1 caja refrigerada		
Material por solicitar por grupo	Reactivos	Equipo
5 Tubos para microcentrifuga estériles 3 pipetas Pasteur con globo		Centrífuga Balanza granataria



Material que proporciona la posta zootécnica	Reactivos	Equipo
3 bovinos		

Desarrollo metodológico de la práctica

Posta zootécnica

Toma de muestra sanguínea de la vena coccígea:

1. Inmovilizar correctamente al bovino con apego a las normas éticas y de bienestar animal.
2. Levantar el maslo de la cola y realizar antisepsia con alcohol al 70% en la zona de la vena coccígea.
3. Con la mano libre localizar por palpación la vena sobre la línea media.
4. Realizar la punción con la aguja y extraer la sangre insertando un tubo al vacío con anticoagulante y otro sin anticoagulante.
5. Rotular los tubos y almacenarlos en la caja refrigerada.

Toma de muestra sanguínea de la vena yugular externa:

6. Inmovilizar correctamente al bovino con apego a las normas éticas y de bienestar animal.
7. Realizar antisepsia con alcohol al 70% de la zona entre el tercio craneal y tercio medio.
8. Hacer presión en la base del cuello y con la mano libre localizar por palpación la vena.
9. Realizar la punción con la aguja y extraer la sangre insertando un tubo al vacío con anticoagulante y otro sin anticoagulante.
10. Rotular los tubos y almacenarlos en la caja refrigerada.

Laboratorio

Centrifugación de las muestras:

11. Centrifugar los tubos a 1500 rpm durante 10 minutos.
12. Separar y transferir cada uno de los componentes a tubos de microcentrífuga con ayuda de una pipeta Pasteur con globo.



Resultados

En un esquema indique como observó sus muestras tomadas con y sin anticoagulante después de centrifugarlas.

Disposición de residuos

Las jeringas y agujas se depositarán en los contenedores para RRBI asignados por el responsable del laboratorio.

Las torundas impregnadas con sangre se esterilizarán para su desecho en la basura.

Los coágulos y restos de muestras sanguíneas serán colocados en una bolsa roja para RPBI y se entregarán al responsable del laboratorio.

El material de vidrio será lavado y secado para su posterior esterilización.

Actividad de integración o cuestionario

1. ¿Para qué se utilizan los anticoagulantes al tomar una muestra sanguínea?
2. ¿Cuál es la diferencia entre plasma y suero sanguíneo?



Práctica 3

Identificación de células del sistema inmune

Introducción

Para poder visualizar y evaluar células sanguíneas individualmente, se debe extender una gota de sangre sobre un portaobjetos (frotis) y teñirla, la tinción más utilizada es el Giemsa. El colorante de Giemsa es una solución en metanol de un colorante ácido (eosina) y dos colorantes básicos (azur y azul de metileno).

Las células que se encuentran en mayor proporción en el torrente sanguíneo son los glóbulos rojos, aproximadamente aparecen 1000 glóbulos rojos por cada glóbulo blanco, sobre un portaobjetos los glóbulos rojos de la mayoría de los mamíferos son células redondas, homogéneas y anucleados (no presentan núcleo), que se tiñen de color rosa asalmonado, hasta rojo, en el caso de las aves, reptiles, anfibios y peces, son ovalados y presentan núcleo.

Dispersados entre los glóbulos rojos, en la preparación se encuentran los glóbulos blancos o también llamados leucocitos. Los leucocitos son células nucleadas de distintos tamaños, algunas contienen gránulos, que se tiñen de diferentes colores. Los leucocitos mononucleares son células de un solo núcleo que incluyen a los linfocitos y monocitos. Estas células son importantes en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa de los animales domésticos y de otras especies de vertebrados. Su identificación es importante para evaluar su proporción, además de identificar su actividad citotóxica y la producción de citocinas principalmente.

Los linfocitos tienen la capacidad, al ser estimulados de variar su forma y tamaño a dimensiones grandes, medianas o pequeñas y puede formar muchas células ovaladas, denominadas células plasmáticas. Los linfocitos maduros son células pequeñas que generalmente apenas y son de mayor tamaño que los glóbulos rojos, estos poseen un núcleo esférico, rodeado de un escaso citoplasma azulado, que a menudo apenas y se distingue. Las células plasmáticas son ovaladas, con núcleo esférico descentralizado donde se observa la cromatina aglutinada en forma de rueda de carreta.

Los monocitos son las células más grandes de los leucocitos, tienen un núcleo pleomórfico o ameboide, que toma diversas formas, desde alargado, redondeado, frecuentemente arriñonado o en forma de herradura, de mariposa o de H, se tiñe con menor intensidad que el resto de los leucocitos.



Los leucocitos polimorfonucleares o granulocitos están comprendidos por los neutrófilos, basófilos y eosinófilos, por norma general presentan gránulos en su citoplasma, su función es importante en la inmunidad innata.

Los neutrófilos son los leucocitos más fácilmente reconocibles, son un poco más grandes que los glóbulos rojos, presentan núcleo alargado de apariencia grumosa densamente teñido, muy compactado y condensado, da la impresión de tener dos o tres lóbulos o segmentos y puede tener varias formas. Al teñir, su citoplasma se puede observar transparente y azul pálido con un número variable de gránulos neutrofílicos (de gris a rosa pálido).

Los eosinófilos (acidófilos), son ligeramente más grandes que los neutrófilos, presentan un núcleo que puede ser en banda o dividido hasta en dos o tres lóbulos, el tamaño, el aspecto, el número y la forma de teñirse de los gránulos varía de acuerdo con las especies, se denominan eosinófilos porque captan eosina y se tiñen color entre naranja-rojo brillante.

Los basófilos se encuentran escasamente en extendidos sanguíneos, presentan un tamaño similar a los neutrófilos y eosinófilos con núcleo alargado, los gránulos basófilos en su citoplasma se tiñen de color azul o violeta.

Las plaquetas o trombocitos son pequeños fragmentos citoplasmáticos, irregulares, carentes de núcleo, derivados de la fragmentación los megacariocitos. La principal función de las plaquetas es intervenir en los procesos de coagulación de la sangre, pero también son potentes moduladoras y efectoras de procesos inflamatorios y de la respuesta inmune. La capacidad de las plaquetas de regular estos procesos se debe a la habilidad de expresar y secretar una gran variedad de moléculas (citocinas) capaces de atraer e interactuar con células de la respuesta inmune innata y adquirida. Las plaquetas poseen receptores tipo Toll que les permiten reconocer agentes patógenos e infecciosos, enviando un estímulo a las células inmunes para que desarrollen respuesta contra ellos. En los extendidos se observan una gran variedad de tamaños y formas, su tamaño se aproxima al de los glóbulos rojos.

La obtención y manejo inadecuado de una muestra sanguínea puede alterar la morfología de las células, además de causar hemólisis de los glóbulos rojos. Una muestra sanguínea hemolizada genera un sesgo negativo y modifica cuantitativamente el resultado final.

Propósito de la práctica

El alumno será capaz de identificar algunas células del sistema inmune a partir de la evaluación microscópica de extendidos sanguíneos teñidos con colorante Giemsa-Wright.



Tiempo de realización de la práctica

Dos horas

Materiales, reactivos y/o equipo

(Nota: en esta práctica se trabajará con tres bovinos para todo el grupo)

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata		
Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
6 portaobjetos		Microscopio
Material por solicitar por grupo	Reactivos	Equipo
	Muestra sanguínea de bovino Metanol Aceite de inmersión Equipo de tinción Giemsa- Wright	

Desarrollo metodológico de la práctica

1. Colocar el portaobjetos limpio y seco en una superficie plana (evitar tocar la superficie del portaobjetos, manejarlo tocando únicamente por los bordes.
2. Homogenizar la muestra sanguínea suavemente.
3. Colocarla en la gradilla y destapar el tubo e inmediatamente.
4. Tomar una muestra con el tubo capilar.
5. Colocar una gota de la muestra en uno de los extremos del portaobjetos, la gota no debe ser muy grande, esto dejaría un frotis demasiado grueso.
6. Con la ayuda de otro portaobjetos extender la muestra formando un ángulo de 30°.
7. Agitar suavemente para secar el frotis lo más pronto posible.
8. Fijar el extendido con metanol durante 3 minutos.
9. Teñir con colorante Giemsa durante 25 minutos
10. Eliminar el exceso de colorante y lavar vigorosamente con agua.
11. Dejar escurrir el extendido hasta que seque.
12. Teñir con colorante de Wright durante 1 minuto



13. Escurrir el exceso de colorante
14. Agregar colorante Wrigth con solución tampón (V/V) durante 5 minutos.
15. Eliminar el exceso de colorante y lavar vigorosamente con agua.
16. Dejar escurrir el extendido hasta que seque.
17. Observar a 100X en el microscopio utilizando aceite de inmersión.

Resultados

Reporte mediante evidencia fotográfica las células del sistema inmune que le fue posible identificar, indicando el nombre y describiendo la función de las células.

Disposición de residuos

- Los portaobjetos con los frotis serán lavados y secados para su entrega.
- Los objetivos de los microscopios deben ser limpiados con papel y entregados.
- Los residuos de la tinción y lavado de los frotis deberán quedar en la caja para tinción, para su deshidratación y almacenamiento temporal.
- Los tubos vacutainer conteniendo la muestra sanguínea serán colocados en el contenedor para RPBI asignado por el responsable.
- Las jeringas y agujas se depositarán en los contenedores para RRBI asignados por el responsable del laboratorio.
- Las torundas impregnadas con sangre se esterilizarán para su desecho en la basura.

Actividad de integración o cuestionario

No aplica



Práctica 4

Diluciones

Introducción

El término dilución quiere decir disminuir la concentración de un soluto en un diluyente en forma ordenada y sistemática. En muchos procedimientos que se realizan en el laboratorio de inmunología y serología es necesario medir o cuantificar la actividad biológica de un reactivo con fines de diagnóstico e investigación. Para poder detectar esta actividad es necesario diluir la suspensión para detectar la mínima concentración de la misma que aún posee actividad biológica. Un ejemplo de ello, es la dilución de un suero (soluta) en solución salina fisiológica (diluyente) para llevar a cabo nuestra prueba y encontrar el punto final de la misma (título). El título de ese suero será expresado como la más alta dilución que se muestre evidencia de una reacción (precipitación, aglutinación, fijación del complemento), y representa la concentración hipotética de un reactivo no diluido.

Las diluciones generalmente se expresan en forma de proporción 1:2, 1:5, 1:10, 1:100 o en forma de cociente $1/2$, $1/5$, $1/10$, $1/100$. Esto se refiere a la relación que existe entre la parte de soluto que se quiere diluir y las partes totales que componen la solución (soluta y diluyente). Por ejemplo, en la dilución 1:2 o $1/2$ el número 1 indica la parte de soluto y el número 2 las partes totales de la dilución (soluta y diluyente). Si se calculan las partes de soluto y diluyente para la dilución 1:2, primero tendríamos que conocer el volumen que se requiere preparar. Conociendo el volumen, éste se divide entre el total de partes de la dilución y se obtiene la cantidad de soluto para la dilución; al restar esta cantidad al volumen total se obtiene la cantidad del diluyente que se tiene que agregar.

En algunas ocasiones se necesita preparar diluciones con concentraciones extremadamente bajas de soluto, hasta un punto que es difícil o imposible en la práctica medir la cantidad en sólido o volumen del soluto. En esos casos es necesario realizar diluciones seriadas o sucesivas a partir de una solución stock hasta alcanzar la concentración deseada.

Existen diferentes tipos de diluciones seriadas, las más utilizadas en el laboratorio de inmunología son las diluciones dobles seriadas, diluciones quintuples seriadas y diluciones decuples seriadas. El factor de dilución va a depender del tipo de dilución seriada que se utilice: dos en las dobles seriadas, cinco en las quintuples y diez en las decuples.



Para preparar una dilución decuple seriada (1:10 o 1/10) se coloca un volumen constante del diluyente correspondiente a nueve partes iguales del volumen final que se vaya a trabajar. Por ejemplo, para preparar una dilución decuple seriada en un volumen final de 6 ml deberá de transferir una décima parte del volumen del primer tubo (concentración del soluto) y diluirlo en nueve partes iguales del diluyente en el segundo tubo. Enseguida, una décima parte del volumen del segundo tubo se transfiere al tercer tubo y así sucesivamente este procedimiento se repite hasta el último tubo. Al final el exceso de volumen del último tubo se desecha (Figura 1).

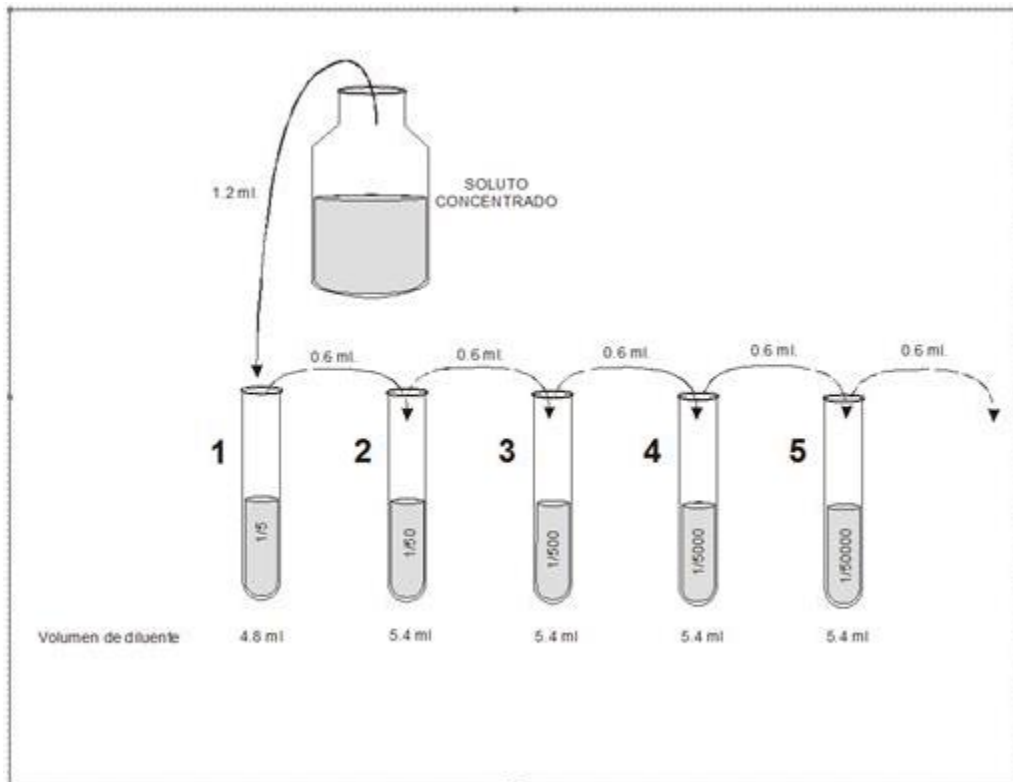


Figura 1. Esquema de una dilución decuple seriada.

Propósito de la práctica

El alumno será capaz de calcular y preparar diferentes de tipos de diluciones que se utilizan comúnmente en el laboratorio de Inmunología.

Tiempo de realización de la práctica

Dos horas



Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata 1 Marcador indeleble		
Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
9 tubos de ensayo 6 pipetas serológicas de 1 o 2 ml 1/100, estériles 1 frasco con agua 1 frasco con colorante vegetal 1 Masking tape 1 Propipeta 1 Gradilla Calculadora		

Desarrollo metodológico de la práctica

1. Realizar los cálculos correspondientes para realizar una dilución única 1:5 en un volumen final de 5 ml.
2. Realizar los cálculos correspondientes para realizar una dilución doble seriada a partir de una dilución 1:2 en un volumen final de 5 ml, hasta alcanzar una dilución 1:128.
3. Preparar las diluciones siguiendo la metodología establecida según sea el caso.

Resultados

Esquematice las diluciones que realizó durante la práctica e indique como obtuvo el cálculo de cada una de ellas.

Disposición de residuos

El contenido de los tubos será eliminado en la tarja.

El material de vidrio será lavado y secado para su entrega

Actividad de integración o cuestionario

1. Defina los términos soluto y diluyente
2. ¿Qué es una dilución doble seriada?
3. ¿Qué utilidad tienen las diluciones seriadas en el laboratorio de Inmunología?



Práctica 5

Prueba de tuberculina

Introducción

La tuberculosis es una enfermedad infecciosa crónica causada por bacterias ácido-resistentes del género *Mycobacterium*.

La Nom-031-ZOO-1995 Campaña Nacional Contra La Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), es de observancia obligatoria en todo el territorio nacional y tiene por objeto, regular y establecer los procedimientos, actividades, criterios, estrategias, técnicas y características para el control y erradicación de la tuberculosis bovina. Su campo de aplicación serán todas las explotaciones pecuarias que manejen bovinos, inclusive para aquellas personas que posean únicamente un animal. En ella se describen las pruebas diagnósticas autorizadas por la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural para la Campaña, que son:

- a) Prueba de tuberculina:
 - 1. en el pliegue caudal
 - 2. cervical comparativa
 - 3. cervical simple
- b) Histopatología.
- c) Aislamiento bacteriológico.

Mycobacterium bovis es la causa principal de la tuberculosis en el ganado bovino. En los animales la principal vía de infección es la aerógena. Esta enfermedad causa grandes pérdidas económicas ya que disminuye la capacidad productiva de los animales en un 20 a 25%.

La respuesta inmune celular tipo tuberculina es una respuesta inmune mediada por células, clasificada como una hipersensibilidad tipo IV. En esta respuesta antígeno-linfocito sensibilizado se liberan una serie de factores biológicamente activos llamados citocinas. Estas inducen cambios funcionales en los linfocitos T y los macrófagos, células que intervienen en la respuesta inmune celular. La reacción a la tuberculina alcanza su mayor intensidad a las 72 horas post- inoculación observándose macroscópicamente una inflamación caracterizada por eritema e induración de la piel debido a una vasodilatación, aumento de la permeabilidad vascular y migración celular al sitio de inoculación. Microscópicamente la población celular que infiltra el tejido corresponde principalmente



a células mononucleares (macrófagos y linfocitos). Se ha demostrado que la inmunidad mediada por células desempeña un papel importante contra muchos de los microorganismos intracelulares obligados.

El antígeno que se utiliza para la prueba de la tuberculina se conoce con el nombre de tuberculina. Actualmente se utiliza el Derivado Proteico Puro (PPD, por sus siglas en inglés). El PPD se prepara a partir de los productos metabólicos del *Mycobacterium*.

Existen varias pruebas de tuberculina; entre ellas la prueba cervical simple, la prueba caudal y la prueba cervical comparativa o doble comparativa:

Prueba cervical simple

Esta prueba se emplea para probar hatos en los que se conoce la existencia de *M. bovis* o bien, para probar ganado que estuvo expuesto directa o indirectamente con hatos infectados con *M. bovis*. Se debe rasurar el área donde se inoculará la tuberculina en el tercio medio superior del cuello (región media cervical). El sitio de aplicación será aproximadamente 10 cm debajo de la cruz, mediante inoculación intradérmica de 0.1 ml de PPD bovino; haciendo la lectura a las 72 ± 6 horas posteriores a su inoculación mediante observación y palpación, por el mismo Médico Veterinario que la aplicó.

Las reacciones pueden clasificarse como:

- Negativa: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación.
- Reactor: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación.

Prueba en el pliegue caudal

Es la prueba básica operativa de rutina, cuando se desconoce la situación zoonosanitaria del hato en materia de tuberculosis. Se efectúa un minucioso examen de ambos pliegues del maslo de la cola, anotando cualquier irregularidad que pueda confundirse con la prueba, en uno de los pliegues debe limpiarse el sitio donde se aplicará el biológico, insertar la aguja en toda su longitud intradérmicamente, haciendo un ángulo de 45° , aplicando 0.1 ml del PPD bovino. La lectura de la prueba se realizará a las 72 horas (± 6 horas), por observación y palpación del sitio por el mismo Médico Veterinario que efectuó la prueba.

Las reacciones se clasifican como:



- Negativa: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación.
- Reactor: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis en el sitio de aplicación.

Prueba cervical comparativa o prueba doble comparativa

En esta prueba se utilizan dos tipos de tuberculina: el PPD bovino y el PPD aviar. El PPD aviar se utiliza para permitir la diferenciación de reacciones consecutivas de una infección por *M. avium*, *M. paratuberculosis*, *Nocardia* y micobacterias atípicas y diferenciarlas de una infección por *M. bovis*. Se inyecta en la tabla del cuello porque se ha observado que la piel de este sitio es mucho más sensible que la piel de la cola. Se inyectan simultáneamente las tuberculinas: PPD aviar y PPD bovino en dos lugares diferentes del mismo lado del cuello, previa medición del grosor de la piel. La lectura de la prueba se realizará a las 72 horas (\pm 6 horas), por observación y palpación del sitio por el mismo Médico Veterinario que efectuó la prueba. Para obtener el incremento del grosor de la piel, se deben restar las lecturas iniciales a las lecturas finales obtenidas a las 72 horas y con estas diferencias y con ayuda de la Gráfica 1., se interpreta el resultado.

Propósito de la práctica

El alumno practicará la técnica de la prueba cervical comparativa para el diagnóstico de tuberculosis en un bovino.

Tiempo de realización de la práctica

Dos horas

Materiales, reactivos y/o equipo

(Nota: en esta práctica se trabajará con tres bovinos para todo el grupo)



Material que trae el alumno	Reactivos por grupo	Equipo por grupo
Overol y botas de hule (cada integrante) Material que trae el grupo 3 lazos para sujetar a los bovinos 3 rastrillos o navajas de afeitar. 30 toallas de papel estroza. 1 jabón de pastilla para manos 6 jeringas de 1 ml (insulina/aguja del N° 27 de 3/8")	3 frascos con 1 ml de solución salina fisiológica o de agua inyectable. 1 frasco con torundas con alcohol	Vernier o calibrador
Material que proporciona la posta zootécnica		
3 bovinos		

Desarrollo metodológico de la práctica

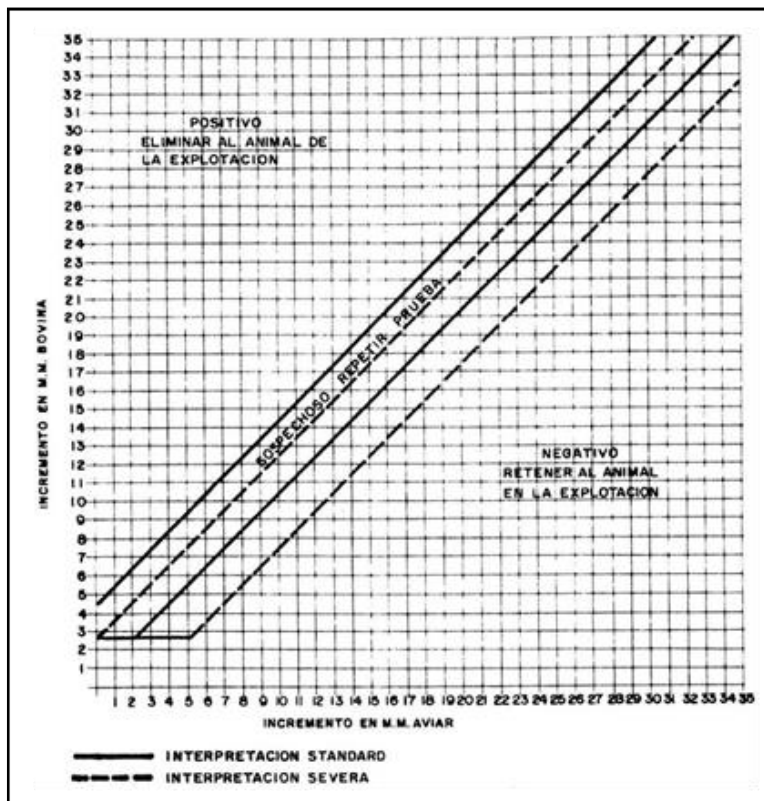
1. Rasurar en el tercio medio de la tabla del cuello, sitio en donde se realiza la prueba, a 10-12 centímetros por debajo de la cruz, un área de 8 centímetros de diámetro aproximadamente.
2. Posteriormente rasurar una segunda área del mismo diámetro, 13 centímetros hacia la porción ventral.
3. Medir el grosor de la piel de cada una de las zonas rasuradas con un vernier. Levantar un pliegue de piel en el centro de las áreas rasuradas y medir. Anotar las mediciones.
4. Realizar la antisepsia en el centro de cada área con alcohol.
5. Inocular 0.1 ml de solución salina fisiológica por vía intradérmica en cada sitio en donde rasuró y aplicó el antiséptico, que corresponderían al PPD aviar en la primera área rasurada y PPD bovino en la segunda, (la formación de una roncha en el sitio de inoculación indica que esta se realizó correctamente).
6. Medir nuevamente el grosor de la piel de ambos sitios a las 72 horas post-inoculación. La medición debe hacerse por la misma persona que hizo la lectura antes de la inoculación. El registro final de las medidas deberá redondearse según el siguiente criterio: de 6.2 baja a 6.0, 6.3 sube a 6.5; de 6.8 sube a 7 (este numeral no se realizará).



7. Anotar los resultados (el instructor le dará lecturas hipotéticas para realizar el apartado correspondiente a resultados).
8. Interpretar la prueba.
9. Lectura del PPD aviar: restar la lectura post-inoculación a la lectura inicial.
10. Lectura del PPD bovino: restar la lectura post-inoculación a la lectura inicial.
11. Una vez obtenidas estas diferencias, proceder a graficar los valores obtenidos tanto de PPD aviar como del bovino y el punto de intersección dará el resultado de la prueba apoyándose en la gráfica.

Resultados

Entregue un reporte con evidencia fotográfica de los pasos que siguió para realizar la prueba doble comparativa para diagnóstico de tuberculosis bovina. Con las lecturas hipotéticas que le dio el instructor y de acuerdo con lo que dicta la NOM-031-ZOO-1995, ¿qué debe hacer con el animal? Integre carátula de identificación y el cuestionario resuelto.



Gráfica 1. Interpretación de la prueba doble comparativa



Disposición de residuos

Las torundas se eliminarán en el contenedor de la basura.

Las jeringas y capuchones deberán eliminarse en el contenedor correspondiente.

Las agujas en el contenedor de color rojo para punzocortantes.

Actividad de integración o cuestionario

1. ¿Cuál es la vía de inoculación en la prueba doble comparativa?
2. ¿Cuánto tiempo se necesita esperar después de inocular para realizar la lectura en la prueba doble comparativa?
3. ¿Qué tipo de inmunidad miden estas pruebas de tuberculina?
4. ¿En qué tipo de hipersensibilidad se basan las pruebas de tuberculina?



Práctica 6

Proyecto semestral: Elaboración del producto biológico inmunizante

Introducción

Muchas moléculas biológicas y células pueden ser usadas para estimular una respuesta inmune. Un resultado de esta respuesta inmune es la estimulación de ciertas células linfoides por el antígeno, seguido de la producción de anticuerpos específicos contra el mismo.

Para el desarrollo de esta práctica, los equipos pares trabajarán en la elaboración de una bacterina y los nones en la de una vacuna de proteína.

BACTERINA (EQUIPOS PARES)

Las bacterias están compuestas por determinantes antigénicos (epitopos) que estimulan la producción de diferentes anticuerpos (uno para cada determinante antigénico distinto). Muchos de estos anticuerpos producen excelentes reacciones in vitro que pueden ser utilizadas para medir la eficiencia del producto. Las bacterinas son suspensiones de bacterias que han sido inactivadas por algún método físico o químico, de manera que no pueden producir o desencadenar la enfermedad, sin embargo, la estructura antigénica la conservan y, por lo tanto, su capacidad de producir una respuesta inmune. En la siguiente gráfica se puede observar el tiempo que tarda en desarrollarse una respuesta inmune primaria al inducirse por una bacterina.

Propósito de la práctica

El alumno elaborará un producto biológico inmunizante: bacterina o vacuna para su uso posterior.

Tiempo de realización de la práctica

Este proyecto será desarrollado en tres sesiones prácticas, durante su desarrollo el alumno se involucrará en los procesos de:

1. Elaboración de un producto biológico inmunizante
2. Uso apropiado del producto biológico inmunizante
3. Evaluación de la respuesta inmune al producto biológico inmunizante



Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el equipo	Reactivos	Equipo
Bata Cofia Cubre bocas Lentes de protección		Estufa bacteriológica Refrigerador 4 balanzas granatarias 4 pisetas con agua destilada
Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
4 tubos bacteriológicos de 15 ml con un cultivo de 18 horas de <i>Salmonella gallinarum</i> 1 tubo bacteriológico de 5 ml, con 3 ml de agar nutritivo inclinado 1 tubo bacteriológico de 5ml, con 3 ml con caldo tioglicolato 1 tubo bacteriológico con 20 ml de solución salina estéril 1 gradilla 1 vaso de precipitado de 50 ml, con capuchón de aluminio. 1 pipeta serológica estéril de 1ml. 1/100 2 pipetas serológicas estériles de 10 ml, 1/10. 1 propipeta Baño María. Termómetro. Trípode y rejilla de asbesto. Mechero 1 vaso de precipitado de 50 ml, sin esterilizar. 2 tubos vacutainer de 10 ml estériles con tapón, para centrifugar la suspensión de bacterias		



Desarrollo metodológico de la práctica

1. Limpiar y desinfectar el área de trabajo.
2. Lavar y realizar la antisepsia de manos.
3. Encender el mechero para generar el área de esterilidad, para trabajar.
4. Colocar en la gradilla los cuatro tubos con cultivo de *Salmonella gallinarum*.
5. Adicionar 2 ml de solución salina estéril (SSF), a cada uno de los tubos con los cultivos, con la primera pipeta de 10 ml. Cuidar el área de esterilidad, recuerde que es un microorganismo patógeno.
6. Despegar el cultivo bacteriano, inclinando y agitando los tubos con el cultivo suavemente de manera que la SSF cubra la superficie del cultivo y lo despegue.
7. Transferir la suspensión de bacterias de cada tubo al vaso de precipitado estéril, (con tapa de aluminio). Cuidar el área de esterilidad.
8. Montar el baño María y colocar el vaso de precipitado con la suspensión de bacterias, cuidar que el capuchón de aluminio se encuentre puesto correctamente.
9. Inactivar en baño María a 70°C durante 50 minutos.
10. Retirar la suspensión de bacterias del baño María.
11. Comprobar la correcta inactivación de la suspensión bacteriana, inocular 0.1 ml de la suspensión bacteriana en el tubo con agar nutritivo (para bacterias aerobias) y en el de caldo tioglicolato (bacterias anaerobias), con la pipeta de 1 ml. Una vez sembrados los cultivos, rotular con el número de equipo, colocar en la gradilla indicada para incubar por 24 horas a 37°C (prueba de esterilidad).
12. Transferir la suspensión bacteriana inactivada a un tubo vacutainer estéril. Cuidar el área de esterilidad.
13. Centrifugar la suspensión de bacterias a 1500 rpm durante 10 minutos.
14. Desechar el sobrenadante en el vaso de precipitado de 50 ml no estéril.
15. Resuspender con solución salina fisiológica estéril, la cantidad necesaria para tener una proporción 1:9 (una parte del botón de sedimentación bacteriano: 9 partes de SSF).
16. Transferir a un tubo vacutainer estéril la suspensión de *S. gallinarum*.
17. Rotular el tubo que contiene la bacterina con el número de equipo y fecha de elaboración.



18. Mantener en cadena fría de la bacterina a 4°C, durante el tiempo en que se desarrolle el proyecto semestral.
19. Realizar la lectura de la prueba de esterilidad. No debe haber presencia de bacterias, en este caso, la bacterina está lista para ser utilizada.
20. Mantener en buen estado la bacterina, para inducir la respuesta inmune en el conejo y para utilizarla como antígeno en la prueba que realizará en la práctica Evaluación de la respuesta inmune.

VACUNA DE PROTEÍNA (EQUIPOS NONES)

Muchas proteínas solubles que son derivadas de los animales son antigénicas. Estas tienen diferentes capacidades de estimular una respuesta inmune, por lo tanto, la selección de la proteína debe ser cuidadosa para poder estimularla. Proteínas solubles como la albúmina sérica, gammaglobulinas o albúmina de huevo, son buenas opciones.

Para el desarrollo de esta práctica, se utilizará como antígeno la albúmina de huevo de gallina, para la elaboración de la vacuna. La secuencia de aminoácidos y la conformación antigénica de la albúmina son específicas para cada especie, por lo que, al inocularla en una especie distinta, el sistema inmune la reconocerá como extraña o no propia y desarrollará una respuesta inmune contra la misma.

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata Cofia Cubrebocas 1 huevo fresco de gallina 2 jeringas de 1ml.	20 ml de solución de benzal al 2%	Estufa bacteriológica Refrigerador



Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
1 mechero 1 vaso de precipitados de 50 ml., estéril, con capuchón de papel aluminio 1 vaso de precipitado de 50 ml., con 42.5 ml de solución salina fisiológica estéril, con capuchón de aluminio. 2 pipetas serológicas estériles de 10ml, 1/10 1 pipeta serológica estéril de 1ml 1/100. 2 tubos vacutainer de 10 ml con tapón, estériles. 1 tubo bacteriológico de 5 ml con 3 ml de agar nutritivo inclinado 1 tubo bacteriológico de 5ml con 3 ml de caldo tioglicolato 1 propipeta 1 gradilla Masking tape		
Material por solicitar por grupo	Reactivos	Equipo
Solución de antibióticos: combinación de penicilina estreptomicina. Frasco con torundas con alcohol		

Desarrollo metodológico

1. Limpiar y desinfectar el área de trabajo.
2. Lavar y realizar la antisepsia de manos.
3. Desinfectar el huevo de gallina utilizando una torunda con alcohol.
4. Encender el mechero para generar un área estéril para trabajar.
5. Abrir el huevo y vaciar el contenido en el vaso de precipitado, vacío y estéril.
6. Preparar una solución de albúmina de huevo al 15%. Medir con la primera pipeta de 10 ml estéril, 7.5 ml de albúmina de huevo cristalina y adicionarla al vaso de precipitado que contiene 42.5 ml de SSF, colocar el capuchón.
7. Apagar el mechero.



8. Dejar la mezcla en un lugar fresco por 10 minutos. Esperar a que la proteína se disuelva en la solución antes de proceder, es importante NO AGITAR, mezclar suavemente sin levantar el vaso de precipitado de la mesa, ya que, puede desnaturalizarse la proteína y producir espuma.
9. Encender nuevamente el mechero.
10. Esterilizar la solución de albúmina adicionando antibióticos (penicilina 1000- 10,000 U.I. más estreptomina 1 – 10 mg / ml) o bien con solución de benzal, con la jeringa de 1ml.
11. Dejar actuar durante 10 minutos.
12. Realizar la prueba de esterilidad: sembrar 0.1 ml de la solución de albúmina en los tubos con agar nutritivo (bacterias aerobias) y caldo tioglicolato (bacterias anaerobias).
13. Rotular con el número de equipo, colocar en la gradilla indicada e incubar a 37°C, durante 24 horas, para verificar que no contenga bacterias.
14. Envasar en los dos tubos vacutainer con tapón estériles, en cada tubo envasar 10 ml, tratar de tomar la porción de la solución de proteína en donde se observe la albúmina o clara de huevo, con la segunda pipeta de 10 ml.
15. Rotular los tubos, anotar el número de equipo y fecha de elaboración, guardar en cadena fría a 4°C, mientras espera el resultado de la prueba de esterilidad, no debe haber crecimiento.
16. Utilizar sólo la vacuna contenida en un tubo. El otro tubo debe quedar de reserva para usarse como antígeno en la prueba para evaluar la respuesta inmune.

Resultados

Reporte el resultado de la prueba de esterilidad que aplicó a su producto biológico inmunizante, responda la actividad de integración y una carátula de identificación.

Disposición de residuos

- El sobrante de la vacuna será eliminado en la tarja, el sobrenadante de la bacterina deberá inactivarse químicamente por 20 minutos en una solución de cloro con jabón.
- El vaso de precipitado en el que se inactivo la vacuna deberá inactivarse químicamente por 20 minutos en una solución de cloro con jabón.



- Los medios de cultivo, una vez realizada la prueba de esterilidad, deberán ser esterilizados y el agar líquido depositado en una bolsa plástica para eliminarlo en la basura municipal.
- Las torundas con alcohol deberán ser eliminadas en la basura.
- Los residuos de los huevos, no utilizados, deberán ser colocados en una bolsa plástica para su eliminación.
- El material de vidrio deberá ser lavado y secado para su entrega.

Actividad de integración o cuestionario.

Comente qué fue lo que salió bien y qué fue lo que salió mal durante la elaboración de la bacterina o de la vacuna.



Práctica 7

Proyecto semestral: Uso apropiado del producto biológico inmunizante

Introducción

Un antígeno es aquello capaz de inducir una respuesta inmune. Un inmunógeno es lo que se inocula o administra a un animal para producir una respuesta inmune específica, por ejemplo, al aplicar una bacterina estamos inoculando bacterias muertas con componentes capsulares, flagelares, membranas y además el vehículo o diluyente en que van suspendidas las bacterias, algunas veces también contiene un adyuvante.

Un adyuvante o coadyuvante es una sustancia que se mezcla con el antígeno para aumentar la respuesta inmune hacia él mismo. Algunos ejemplos de adyuvantes son: las sales de aluminio, el adyuvante incompleto de Freund, el adyuvante completo de Freund, los aceites minerales.

Muchas moléculas biológicas y células pueden ser usadas para inducir o estimular una respuesta inmune. Uno de los resultados de este proceso es la estimulación de los linfocitos B por el antígeno, para que este produzca anticuerpos específicos contra el antígeno que los estimuló. Los anticuerpos se encuentran presentes en muchos líquidos del cuerpo, pero son más abundantes en el suero.

La inmunización activa consiste en administrar el inmunógeno a un animal con el fin de estimular una respuesta inmune primaria. La re-inmunización produce una respuesta inmune secundaria. La respuesta primaria no se obtiene de inmediato, ya que se comienza a detectar anticuerpos alrededor del quinto a sexto día post-inoculación, obteniéndose un nivel máximo alrededor de los 15 a 21 días post-inoculación.

La respuesta primaria puede ser reestimulada mediante la administración repetida del inmunógeno, la respuesta secundaria es más rápida y con la producción con un mayor título de anticuerpos, como se observa en la siguiente gráfica.

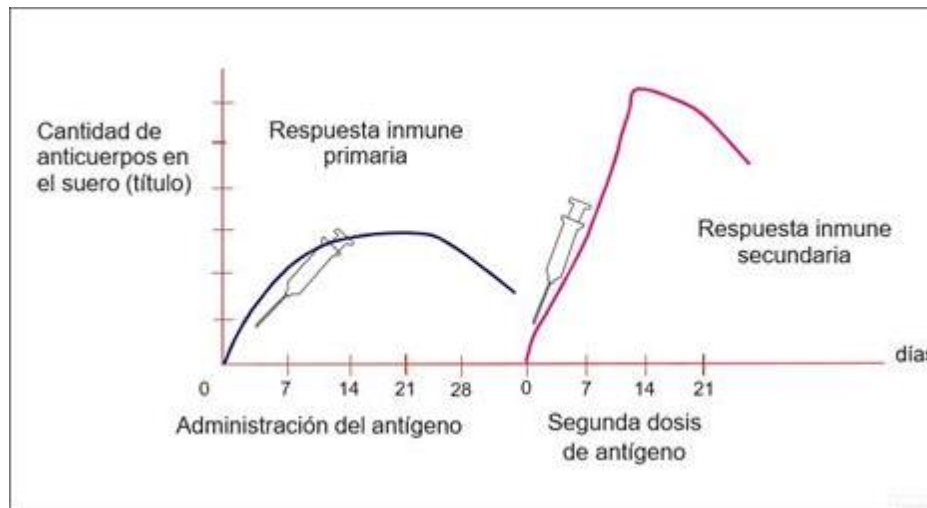
Respuesta inmune primaria y secundaria

Al elaborar un esquema de inmunización, debe tenerse en cuenta el antígeno a utilizar y la especie animal en que se va a emplear para estimular una respuesta inmune, es decir, la facilidad para hacerlo no es lo mismo utilizar un equino, que un conejo o un cuy. Para estimular una respuesta secundaria, en general la inoculación cada 4 a 7 días funciona adecuadamente. La mayoría de las veces se utilizan las vías subcutánea e intramuscular. La dosis que se aplique depende también del tamaño de las masas musculares del



animal. No todos los individuos de la especie que sea responden igual a todas las vacunas y a una misma vacuna, no todos los animales responden. Las proteínas pueden producir anafilaxia, sobre todo cuando se inocular en forma repetida, es decir cuando se han sensibilizado a ellas, previamente.

Recuerde que el uso de los animales de laboratorio es un privilegio que no debe de tomar a la ligera, requieren cuidados, manejo adecuado y un trato humanitario. Tómelo en cuenta al inmunizar su modelo animal.



Propósito de la práctica

El alumno aplicará sus conocimientos teóricos para diseñar un esquema de inmunización adecuado para estimular una respuesta inmune utilizando el producto biológico inmunizante que elaboró.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Overol Botas Bata 3 jeringa de 3ml con aguja 21 o 22. Bebedero de chupón para conejo	Aceite mineral (adyuvante)	



Etiqueta, marcador y cinta adhesiva, para identificar la jaula		
Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
Bacterina o Vacuna previamente elaborada 2 torundas con alcohol Jaula		
Material proporcionado por la posta zootécnica para el grupo	Reactivos	Equipo
Espacio en la Posta Zootécnica para realizar el proyecto semestral Alimento para conejo para 21 días. 1 rack con 10 jaulas para el alojamiento de los conejos 10 conejos. Material para limpieza y desinfección del espacio y jaulas.		

Desarrollo metodológico de la práctica

Posta zootécnica

1. Limpiar el área que se asigne para el desarrollo del proyecto semestral, entre varios integrantes del grupo.
2. Limpiar y desinfectar la jaula asignada a cada equipo.
3. Identificar la jaula con el número de equipo.
4. Acondicionar la jaula colocando bebedero y comedero; agua y alimento.
5. Alojarse al conejo que se le asigne, manejar adecuadamente para evitar estrés.
6. Revisar, atender a su conejo, eliminar los desechos y mantener limpia el área de su jaula, diariamente durante los 21 días de duración del proyecto semestral.
7. Iniciar la aplicación de las inmunizaciones de acuerdo con el esquema que va a elaborar en el laboratorio, verificar que no haya signos de anafilaxia.



Laboratorio

1. Diseñar un esquema de inmunización para aplicarlo en su conejo y entregar una copia al instructor.
2. Sacar el producto biológico inmunizante que elaboró del refrigerador.
3. Preparar el mismo adicionando aceite mineral como adyuvante; primero cargar la dosis que determinó utilizar de su producto en la jeringa y después 0.25 del adyuvante. Mezclar en la jeringa.
4. Guardar el resto de la vacuna en refrigeración (cadena fría).
5. Manejar adecuadamente su conejo para inmovilizarlo.
6. Desinfectar el sitio de inoculación
7. Aplicar el producto biológico inmunizante: bacterina o vacuna.

ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN

Equipo No.				
Especie Animal				
Jaula No.				
Tipo de producto inmunizante				
DÍA	FECHA	VOLUMEN DE INOCULACIÓN	VÍA DE INOCULACIÓN	OBSERVACIONES

Resultados

Elabore un reporte que contenga el esquema de inmunización que está utilizando. Comente que fue lo que salió bien durante la aplicación del producto al conejo y que salió mal. Integre el cuestionario y portada de identificación.



Disposición de residuos

Las jeringas y capuchones serán eliminadas en el contenedor indicado por el. Las agujas serán eliminadas en el contenedor rojo para punzocortantes.

Las torundas utilizadas serán eliminadas en el contenedor para la basura.

Los conejos utilizados serán albergados en la Posta Zootécnica y quedarán bajo el cuidado y la responsabilidad del equipo en cuanto a su mantenimiento y limpieza diaria.

El excremento que generen los animales deberá ser retirado diariamente e incorporado a la composta de la posta zootécnica del Centro Universitario.

Actividad de integración o cuestionario

1. ¿Qué es un producto biológico inmunizante y qué es un inmunógeno?
2. ¿Qué es un adyuvante, de dos ejemplos?
3. ¿Cuál es el tiempo en que se estimula completamente una respuesta inmune primaria y que diferencias existe con una respuesta secundaria?
4. ¿Qué es un esquema o programa de inmunización?



Práctica 8

Calostrometría

Introducción

El calostro representa las secreciones acumuladas de la glándula mamaria al final de la gestación. Los animales recién nacidos que maman calostro tienen una actividad proteasa baja en el tracto digestivo, la que se reduce aún más por el contenido de inhibidores de tripsina presentes en el calostro de la madre. Por lo tanto, las proteínas calostrales no se degradan para utilizarse como fuente de alimento y alcanzan el intestino delgado intactas. Estas inmunoglobulinas (Ig) se unen a receptores para la fracción cristalizante (FcRn) presentes en las células epiteliales del intestino de los recién nacidos, una vez unidas estas inmunoglobulinas a estos receptores, entran por endocitosis en las células epiteliales intestinales, pasan por los vasos quilíferos y posiblemente a los capilares intestinales, finalmente alcanzan la circulación sanguínea recibiendo así los animales recién nacidos una transferencia masiva de inmunoglobulinas maternas. En los rumiantes la absorción de estas inmunoglobulinas no es selectiva, pasando todas las inmunoglobulinas, aunque la IgA se vuelve a excretar gradualmente.

La duración de la permeabilidad intestinal varía entre las especies y entre las clases de inmunoglobulinas, por lo general es más elevada justo después del nacimiento, desciende alrededor de las 6 horas, posiblemente porque las células que expresan los FcRn, son sustituidas por células epiteliales intestinales más maduras que no expresan estos receptores. Como regla general la absorción de toda clase de inmunoglobulinas habrá disminuido a niveles bajos tras 24 horas después del nacimiento, aproximadamente. La alimentación con calostro tiende a acelerar este cierre, mientras que el retraso en la ingestión de alimento ocasiona un ligero retraso en el cierre (hasta 33 horas). Asimismo, la presencia de la madre puede asociarse al aumento de la absorción de inmunoglobulinas. Un buen manejo debería garantizar que los becerros ingieran calostro en las 6 horas siguientes al parto, generalmente, la cantidad de calostro que se ofrece a los becerros recién nacidos es de 2 litros en cada una de las tomas que se harán durante el día. Para asegurar la absorción máxima de calostro, el becerro después de ingerir dos litros de calostro en las primeras dos horas después del parto (hasta 8 horas es el límite), requiere una segunda alimentación, la cual debe recibir a las 12-14 horas de edad con la finalidad de desplazar el primer calostro a lo largo del intestino delgado aumentando la superficie de absorción, el calostro provee además fuentes de energía (lactosa) requeridas con urgencia por el becerro.



El calostro es una fuente rica de proteínas no específicas tales como la leucina α_1 y β_4 , lactoferrina, insulina, factores de crecimiento de insulina, factores anti- estafilocócicos y otros. Estas proteínas son importantes para la resistencia a enfermedades infecciosas.

El calostro es el mecanismo principal a través del cual los becerros pueden obtener inmunidad específica contra agentes infecciosos, la cual puede ser estimulada a través de la vacunación. Es bien conocido que las vaquillas de primer parto contienen menor volumen de calostro producido al parto y menor diversidad de anticuerpos. Por definición, únicamente la secreción del primer ordeño después del parto debe ser denominada calostro. Las secreciones del segundo al octavo ordeño (cuarto día de la lactancia) son llamadas leche de transición, ya que su composición gradualmente se asemeja a la composición de la leche entera.

Integrar y congelar una mezcla de calostro de varias vacas o de calostro de las vacas con mayor número de años en la explotación, es adecuado. Un método práctico para evaluar la calidad del calostro es conocido como prueba de calostrometría, permite seleccionar los calostros de mayor gravedad específica y por lo tanto de mayor concentración de anticuerpos al parto, congelarlos y posteriormente descongelarlos en agua tibia (por debajo de 50 grados centígrados) o bien si se dispone de un horno microondas se puede hacer en forma más rápida a temperatura media, para su administración, de esta manera es posible preservar los anticuerpos. Se realiza utilizando un aparato llamado calostrómetro, que mide la gravedad específica del calostro y estima el total de gama- globulinas basándose en una relación estadística. Se colecta el calostro del primer ordeño en un recipiente y se depositan 250 ml en una probeta, se recomienda medir las muestras a una temperatura entre 20 y 22 °C., se introduce el calostrómetro para que éste flote en la muestra, separando la espuma de la superficie, para evitar lecturas falsas o erróneas. Se lleva a cabo la lectura en la escala cualitativa (en colores) y la cuantitativa (mg/ml) del calostrómetro y se registran las lecturas.

El calostro se clasifica en tres categorías de acuerdo con la densidad o gravedad específica, las cuales son:

1. Superior: color verde oscuro, con gravedad específica de 1.047-1.075 y una concentración de inmunoglobulinas de 50 a 140 mg/ml de calostro.
2. Moderada: color verde claro, con gravedad específica de 1.035 -1.046 y una concentración de inmunoglobulinas de 20 a 50 mg/ml de calostro.
3. Inferior: color rojo, con gravedad específica menor a 1.035 y una concentración de inmunoglobulinas menor a los 20 mg/ml de calostro. No debe utilizarse.



Propósito de la práctica

El alumno evaluará la calidad de diferentes muestras de calostro mediante la prueba de calostrometría.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
5 muestras de 250 ml de calostro congelado de diferentes vacas (informarse de que número de parto es y de cuantos días después del parto) Cerillos		
Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
5 baños María 5 trípode 5 rejillas de asbesto 5 mechero 5 vasos de precipitado 500 ml 5 termómetros 5 probetas de 250 ml plásticas Calostrómetro		

Desarrollo metodológico de la práctica

1. Descongelar y atemperar la muestra de calostro a 20 – 22 °C, en baño María.
2. Cuidar la formación de espuma, no agitar demasiado.
3. Medir 250 ml de la muestra en la probeta.
4. Introducir el calostrómetro, cuidar que éste no toque las paredes de esta.
5. Realizar la lectura de la muestra de calostro.
6. Enjuagar con agua caliente el calostrómetro.
7. Anotar en forma de tabla en el pizarrón el resultado de las cinco lecturas, agregar el número de parto y el día post parto en que se obtuvo la muestra.



Resultados

Reporte en forma de tabla los resultados las lecturas de las cinco muestras de calostro, integre el cuestionario y portada de identificación.

Disposición de residuos

Las probetas, termómetros y vasos de precipitados deberán lavarse y secarse para su entrega

Las muestras de calostro se guardarán en refrigeración.

Actividad de integración o cuestionario

1. ¿Qué es lo que mide el calostrómetro?
2. De acuerdo con la lectura que obtuvo ¿cómo clasifica cuantitativa y cualitativamente el calostro?
3. De acuerdo con el resultado obtenido, qué decisión tomaría en cuanto a la conservación, ¿sería adecuado conservar el calostro probado? y ¿por qué?



Práctica 9

Prueba de aglutinación

Introducción

La prueba de aglutinación al igual que otras pruebas serológicas es útil para comprobar de forma rápida la presencia de anticuerpos en muestras de suero o plasma. Esta prueba se basa en la unión entre antígenos particulados y anticuerpos, suele tratarse de una prueba sensible, pero con poca especificidad. Ejemplos de este tipo de pruebas es la aglutinación con el antígeno Rosa de Bengala empleada en el diagnóstico de la brucelosis (Figura 1).

Clasificación de las reacciones de aglutinación:

Aglutinación directa

Un antígeno celular o de partículas insolubles es aglutinado directamente por anticuerpos. Un ejemplo de este tipo es la aglutinación de los eritrocitos o glóbulos rojos del grupo A por antisueros anti- A, la aglutinación de los eritrocitos RH positivos por el antisuero anti-D. Gran cantidad de partículas como eritrocitos, bacterias, hongos y virus pueden ser aglutinados por anticuerpos séricos.

Aglutinación indirecta

Se basa en que los antígenos solubles pueden fijarse por diversos procedimientos sobre partículas inertes, por ejemplo, glóbulos rojos, colesterol y partículas de látex. De esta manera, las partículas recubiertas de antígeno reaccionaran con los anticuerpos de la muestra.



Resultado positivo

Resultado negativo

Figura 1. Prueba de aglutinación con al antígeno Rosa de Bengala.



Propósito de la práctica

El alumno aplicará las bases teóricas para realizar, interpretar y aplicar en forma práctica la prueba de aglutinación.

Tiempo de realización de la práctica

Una hora

Materiales, reactivos y/o equipo

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata		
Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
6 porta objetos 6 palillos de madera 6 pipetas serológicas de 1 o 2 ml 1/100, estériles. 1 Propipeta	Suspensión de glóbulos rojos de ave al 4% Dilución de sueros hiperinmunes de conejo	

Desarrollo metodológico de la práctica

1. Colocar en portaobjetos por separado 3 alícuotas de la suspensión de glóbulos rojos de ave al 4% (antígeno).
2. Agregar una alícuota de la dilución de los sueros de conejo (anticuerpos).
3. Utilizando palillos diferentes de madera homogenizar cada una de las muestras tratando de extenderlas en forma circular.
4. Al terminar de mezclar las muestras, depositar los palillos inmediatamente en el contenedor asignado para su inactivación.
5. Incubar la prueba a temperatura ambiente durante 1-2 minutos.
6. Interpretar la prueba, se determinará como resultado positivo la formación de grumos en la muestra y como resultado negativo si la muestra no presenta cambios.

Resultados

Reporte mediante evidencia fotográfica los resultados obtenidos en las muestras.



Disposición de residuos

Los portaobjetos con las pruebas serán colocados en un recipiente para su inactivación química con una mezcla de cloro-jabón, para su posterior lavado, secado y entrega.

Los palillos de madera y torundas de algodón serán colocados en un recipiente para su inactivación química con una mezcla cloro-jabón, para su posterior eliminación en la basura.

Actividad de integración o cuestionario

1. ¿Por qué ocurre la aglutinación de los glóbulos rojos de ave?
2. ¿Qué clase de anticuerpos intervienen durante el proceso de aglutinación en la prueba?
3. ¿Esta prueba sería un método cualitativo o cuantitativo? ¿Por qué?



Práctica 10

Visita externa al Centro Nacional de Investigación Disciplinaria en Salud Animal e Inocuidad del INIFAP:

Desarrollo y aplicación de pruebas para el inmunodiagnóstico de enfermedades parasitarias

Introducción

Durante los últimos años el avance tecnológico ha permitido desarrollar técnicas que ayudan al inmunodiagnóstico de múltiples enfermedades en animales. El inmunodiagnóstico permite detectar la presencia de anticuerpos después de la exposición a un determinado antígeno.

Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia es una técnica para el inmunodiagnóstico que se emplea para detectar reacciones “in vitro” antígeno-anticuerpo. El principio de esta técnica se basa en que el anticuerpo se conjuga químicamente con un colorante fluorescente (fluorocromo) como es el isotiocianato de fluoresceína (FITC) o la Rodamina; sin que se vean afectadas por ello sus propiedades inmunológicas. Estos fluorocromos producen fluorescencia cuando se exponen a la luz ultravioleta (UV), lográndose de esta forma visualizar dicha reacción con la ayuda de un microscopio de luz ultravioleta. Un colorante fluorescente o fluorocromo es aquel colorante que, al ser incidido por un rayo de luz de determinada longitud de onda, va a emitir un rayo de luz de longitud de onda mayor al de la luz que lo excitó por un tiempo no mayor a 10^{-7} a 10^{-8} segundos. Si esta luz se emite en un tiempo mayor, se considera como sustancia fosforescente.

Fluorocromos más utilizados en inmunología		
Fluorocromo	Excitación	Emisión
Isotiocianato de fluoresceína (FITC)	490 (azul)	520 (verde-amarillo)
Tetrametilrodamina (TMR)	510-520 (verde)	700 (rojo)
Naranja de acridina	490 (azul)	690 (amarillo-naranja)
Auramina	490 (azul)	600 (amarillo)



Ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA)

El ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés) se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado (adherido) sobre un soporte (inmoadsorbente), la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmobilizada y podrá ser revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o lector de microplacas.

Inmunoblot

Inmunoblot es una herramienta de gran importancia para la identificación de proteínas específicas en un extracto proteico complejo. La técnica implica la separación de las proteínas a través de electroforesis en un gel desnaturalizante de poliacrilamida (SDS-PAGE) y su transferencia a una membrana de nitrocelulosa usando un campo eléctrico (electrotransferencia), posteriormente la proteína de interés se identifica mediante anticuerpos conjugados a marcadores radiactivos o enzimáticos (inmunodetección) (Figura 1).

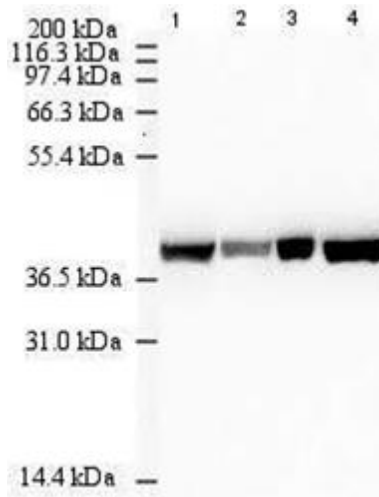


Figura 1. Prueba de inmunoblot.

Propósito de la práctica

El alumno conocerá los fundamentos de las pruebas desarrolladas en el CENID-SAI, INIFAP como inmunofluorescencia indirecta, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas e inmunoblot y su aplicación para el inmunodiagnóstico de enfermedades parasitarias.



Tiempo de realización de la práctica

Seis horas

Materiales, reactivos y/o equipo

Ninguno

Desarrollo metodológico de la práctica

1. Arribar a las instalaciones del CENID-SAI, INIFAP.
2. Atender la explicación de los fundamentos de las pruebas para el inmunodiagnóstico.
3. Visitar los laboratorios.

Resultados

Esquematice la prueba de ELISA que realizó e informe del resultado obtenido. Describa como se interpreta la prueba de ELISA en el CENID-SAI, INIFAP.

Describa los resultados al observar una muestra de suero en el microscopio de epifluorescencia.

Reporte mediante evidencia fotográfica el resultado obtenido con la técnica de inmunoblot. Escriba un comentario sobre lo que a usted le pareció más relevante durante su visita al CENID-SAI, INIFAP.

Disposición de los residuos

No hay

Actividad de integración o cuestionario

1. ¿Qué método de ELISA realizan en el CENID-SAI, INIFAP?
2. ¿Qué es lo que detectan con esta prueba?
3. ¿Qué tipo de muestra es la que emplean?
4. ¿Cómo la interpretan?



5. ¿Describa brevemente el proceso de elaboración del antígeno que se utilizan en la prueba de inmunofluorescencia indirecta para el diagnóstico de babesiosis bovina en el CENID-SAI, INIFAP?
6. ¿Cómo preparan y conservan los extendidos sanguíneos para el diagnóstico?
7. ¿Qué es una muestra de suero sospechosa?
8. ¿Cómo se llama el fluorocromo que utilizan en la prueba de inmunofluorescencia indirecta?
9. ¿Cuál es la aplicación de la técnica de inmunoblot en el diagnóstico de la babesiosis bovina?



Práctica 11

Proyecto semestral: Evaluación de la respuesta inmune

Introducción

Para evaluar la respuesta inmune a la vacunación, se puede utilizar cualquier prueba serológica para determinar el título de anticuerpos específicos presentes en el suero del animal vacunado. El título, es el término utilizado para describir la concentración de anticuerpos y es usualmente expresado como el recíproco de la mayor dilución que presenta una reacción antígeno-anticuerpo visible.

En esta práctica se utilizarán la prueba de aglutinación para evaluar la respuesta inmune a la vacunación con la bacterina de *Salmonella gallinarum*, ya que se trata de bacterias (células), que se comportan como antígeno particulado y que, por lo tanto, se mantienen en suspensión (con escasa o nula tendencia a sedimentarse). Caso contrario, para medir la repuesta a la vacunación con la vacuna de albúmina de huevo, se utilizará la prueba de precipitación ya que las características del antígeno son diferentes: es un antígeno molecular (proteína) y se encuentra en solución. Al mezclar una solución de antígenos solubles con sus anticuerpos correspondientes se presentará la unión antígeno anticuerpo. Si la proporción de estos dos elementos es equivalente, se formarán complejos inmunes insolubles dando como resultado la formación de grumos o un precipitado visible a simple vista respectivamente.

Para obtener el suero de los animales vacunados, puede utilizarse la punción cardíaca, aunque puede ser difícil, si no se tiene la práctica suficiente. Una alternativa es usar alguna otra vía, como la punción en la vena marginal de la oreja. La muestra debe tomarse sin anticoagulante y procesarla para la obtención del suero y su posterior evaluación. Debemos recordar que el tiempo que tarda en aparecer el máximo título de anticuerpos después de estimular una respuesta inmune humoral es de 15 a 21 días.

Propósito de la práctica

El alumno evaluará la respuesta inmune al producto inmunizante que elaboró y utilizó.

Tiempo de realización de la práctica

Tres horas



Materiales, reactivos y/o equipo

BACTERINA (EQUIPOS PARES)

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata 2 jeringa de 10 ml con aguja calibre 20 2 jeringas de 1ml con aguja 26 o 27		2 balanzas granatarias Centrífuga Estufa bacteriológica Lámpara para observar la aglutinación
Material por solicitar equipo	Reactivos	Equipo
2 tubos vacutainer de 10ml, limpios 1 pedazo de Masking tape 1 gradilla 2 palillos de madera 1 portaobjetos La bacterina elaborada por el equipo (antígeno) 2 pipetas serológicas estériles de 1 ml 1/100 1 propipeta		
Material por solicitar grupo	Reactivos	Equipo
2 pisetas con agua destilada Frasco con torundas con alcohol		

Desarrollo metodológico de la práctica

1. Realizar la toma de muestra sanguínea por vía intracardiaca del conejo que inmunizó, utilice una jeringa de 10 ml con aguja del número 20 (amarilla). Colectar 5ml.
2. Colocar la jeringa conteniendo la muestra la muestra a temperatura ambiente y espere a que coagule.
3. Colocar la muestra en la estufa de incubación a 37°C, previamente separar el coagulo de las paredes de la jeringa, jalando el émbolo.
4. Incubar aproximadamente una hora, revisar cada 15 minutos, hasta observar que ésta haya exudado el suero.
5. Procesar la muestra para obtener el suero limpio.
6. Realizar la prueba de aglutinación en placa: colocar en el portaobjetos con la primera pipeta una gota del suero a probar. Con la segunda pipeta adicionar sobre ésta una



- gota de la bacterina previamente homogenizada.
7. Con el palillo de madera mezclar ambos reactivos tratando de formar un círculo amplio para facilitar la lectura.
 8. Incubar por hasta 4 minutos a temperatura ambiente, para realizar la lectura con ayuda de una lámpara para observar el resultado.
 9. Leer la prueba: la formación de grumos es un resultado positivo, la ausencia de grumos, la mezcla permanece homogénea, es un resultado negativo.
 10. Tomar evidencia fotográfica del resultado de su prueba.

VACUNA DE PROTEÍNA (EQUIPOS NONES)

Material que trae el alumno	Reactivos	Equipo
Bata 2 jeringa de 10 ml con aguja calibre 20 2 jeringas de 1ml con aguja 26 o 27		
Material por solicitar por equipo	Reactivos	Equipo
Pedazo de Masking tape Vacuna de proteína, el tubo de reserva (antígeno) Tubo con 10 ml de solución salina fisiológica estéril (diluyente) 1 gradilla 5 tubos vacutainer estériles de 5 ml 2 pipetas serológicas estériles de 2ml. 1/100 1 propipeta		2 balanzas granatarias Centrífuga Estufa bacteriológica Lámpara para observar la aglutinación

Desarrollo metodológico de la práctica

1. Realizar la toma de muestra sanguínea por vía intracardiaca del conejo que inmunizó, utilice una jeringa de 10 ml con aguja del número 20 (amarilla). Colectar 5ml.
2. Colocar la jeringa conteniendo la muestra a temperatura ambiente y espere a que coagule
3. Colocar la muestra en la estufa de incubación a 37°C, previamente separar el coagulo

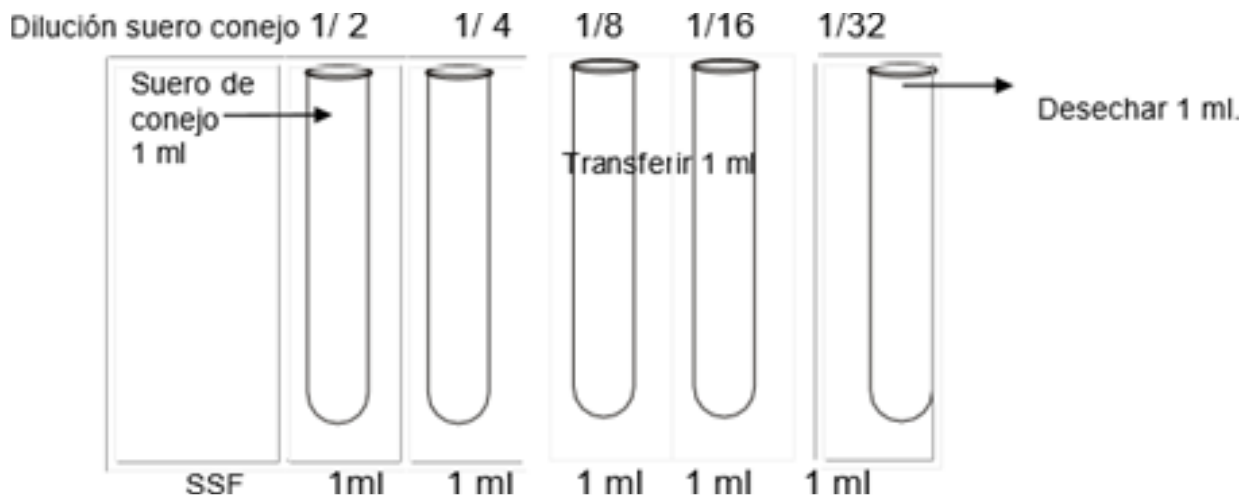


de las paredes de la jeringa, jalando el émbolo.

4. Incubar aproximadamente una hora, revisar cada 15 minutos, hasta observar que ésta haya exudado el suero
5. Procesar la muestra para obtener el suero limpio
6. Realizar la prueba de precipitación para verificar si estimuló respuesta inmune.

Prueba de precipitación en tubo

1. Calcular una dilución doble seriada del suero del conejo en solución salina fisiológica, con una dilución inicial de $\frac{1}{2}$, en un volumen inicial de 2 ml, en 5 tubos, colocar los tubos en la gradilla e identificar con masking tape, la dilución que tiene cada uno.
2. Preparar la dilución utilizando la primera pipeta para colocar el diluyente y con la misma, el suero a probar en el primer tubo, transferir un ml de un tubo a otro, descartar 1ml del último tubo en la tarja.
3. Adicionar con la segunda pipeta 1ml de antígeno (vacuna), a cada tubo. Tratar de tomar de donde se vea la albúmina.
4. Incubar a temperatura ambiente durante 24 horas
5. Leer la prueba, la presencia de una red de precipitación en el fondo del tubo indica una reacción antígeno-anticuerpo.
6. Determinar el título de anticuerpos del suero del conejo vacunado.





Resultados

Prueba de precipitación (equipos nones)

Reporte con evidencia fotográfica la prueba de aglutinación rápida en placa y el resultado que obtuvo. Concluya si su producto biológico inmunizante utilizado bajo el esquema que propuso funcionó y estimuló una respuesta inmune. Integre portada de identificación.

Prueba de precipitación (equipos nones)

Reporte con evidencia fotográfica el resultado de la prueba de precipitación (levantando la gradilla, que se vean los fondos de los tubos). Concluya si su producto biológico inmunizante utilizado bajo el esquema que propuso funcionó y estimuló una respuesta inmune. Exprese el título que alcanzo el suero de conejo. Integre portada de identificación.

Disposición de residuos

Los animales utilizados serán entregados nuevamente a la Posta Zootécnica. El material de vidrio será lavado y secado para su entrega.

Las vacunas serán eliminadas en la tarja (previamente inactivadas).

Las jeringas y capuchones serán colocadas en el contenedor correspondiente. Las lancetas y agujas serán colocadas en el contenedor rojo para punzocortantes. Las torundas y palitos de madera serán eliminados en la basura.

Actividad de integración o cuestionario

No hay



V. Referencias Bibliográficas

- Alonso F. R. Alimentación y manejo del ternero. [Disponible en] <http://www.geocities.com/asoevefas/diarrea-becerro.doc> 07-04-08
- Blanco Ochoa, A. Alimentación en becerras lactantes. [Disponible en] <http://www.fmvz.unam.mx/bovinotecnia/BtRgZooG001.pdf> 07-04-08.
- Virología Práctica, Acribia, Zaragoza, España, pp. 19-28.
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: 2007. Inmunología de Kuby. Ed. McGraw-Hill. México. Sexta edición. ISBN 13: 978-970-10-6454-2.
- Myers, L.R. 1989. Immunology a Laboratory Manual, WMC. Brown Publishers, Dubuque, Iowa.
- NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional Contra La Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*), en http://www.rramericas.oie.int/in/proyectos/Camevet/Normas_paises/Normativas%20Paises/Mexico/Nom-031.htm
- NOM-062-ZOO-1999, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo.
- National Research Council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. Washington, DC: The National Academies Press. <https://doi.org/10.17226/12910>.
- Rovozzo, G.C. and Burke, C.N. 1973. A manual of Basic Virological Techniques, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey, USA, p. 259.
- Tizard, I.R. 2000. Inmunología Veterinaria. McGraw-Hill. 5ª México. Morilla, A. 1989. Inmunología Veterinaria. Diana. 1ª México.
- Tizard, I.R.: 2004. Veterinary immunology, an introduction. Saunders, Elsevier, USA. Sevent edition. ISBN 0-7216-0136-7.
- Tizard, I.R. 2009. Introducción a la Inmunología Veterinaria. Octava Edición. Elsevier, Barcelona España.
- Voigt. G.L. 2001. Conceptos y técnicas hematológicas para técnicos veterinarios. Editorial Acribia, España.
- Kawamura, A. 1977. Fluorescent antibody techniques and their applications, University of Tokio Press. 2ª