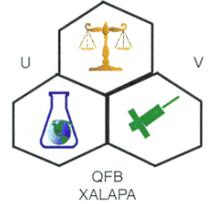




Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



“GUÍA DEL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA”



Elaboraron

MAC. María Azucena Mendoza Fernández
MC. Ricardo Galán Zamora

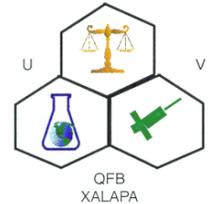


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



INTRODUCCIÓN

La presente guía de Prácticas de laboratorio de Inmunología está diseñada de acuerdo con el programa de teoría de Inmunología que forma parte del área de formación a la disciplina del plan de estudios vigente de la Licenciatura en Químico Farmacéutico Biólogo de la Universidad Veracruzana Región Xalapa. Las prácticas de laboratorio propuestas en esta guía tienen el propósito de que los estudiantes desarrollen competencia en la ejecución e interpretación de las principales reacciones inmunológicas que son utilizadas para determinar antígenos y anticuerpos, como son: aglutinación, precipitación, lisis, floculación, fagocitosis, ELISA, inmunofluorescencia e hipersensibilidad. Éstas se llevan a cabo utilizando métodos cualitativos o semicuantitativos, los que tienen aplicación tanto en el área de diagnóstico como de elaboración de productos biológicos. Durante el desarrollo del laboratorio se fortalece la formación de los estudiantes en el manejo de animales de experimentación, medidas de bioseguridad y manejo de residuos biológico-infecciosos. La metodología está centrada en el desarrollo de habilidades de ejecución y de pensamiento que permitan al estudiante desempeñar adecuadamente las pruebas de laboratorio incluidas en el programa; fomenta tanto el trabajo individual como colectivo. En la evaluación del aprendizaje se consideran la realización de prácticas, participación, entrega de reportes por escrito, así como exámenes teóricos y prácticos.

Finalmente, es importante que el estudiante mantenga un registro completo de sus experimentos, por lo que los docentes que imparten esta experiencia educativa recomiendan el uso de una bitácora, cuyo objetivo es que el alumno conozca y aprenda la forma en que se realizó el desarrollo experimental, además en ella se deberán escribir los resultados, cálculos, conclusiones, etc. Este registro se hace al momento en que se realiza la práctica y debe estar escrito de manera clara para que cualquiera pueda entender cómo se realizó la práctica y cuáles fueron los resultados obtenidos.

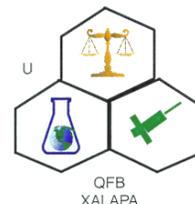


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



JUSTIFICACIÓN

El laboratorio de Inmunología tiene gran importancia en la formación del Q.F.B ya que está centrado en la metodología analítica que se aplica específicamente para la ejecución de pruebas que se basan en reacciones antígeno-anticuerpo y que se aplican en diversas áreas de conocimiento que forman parte de su quehacer profesional, como son el diagnóstico de enfermedades causadas por bacterias, hongos, parásitos, virus, aquellas propias del sistema inmune y su prevención mediante la preparación de productos biológicos; además de ser parte fundamental en muchos métodos de diagnóstico de diversas moléculas del organismo, fármacos, enzimas, etc. Este laboratorio refuerza en el estudiante la importancia del control de calidad de las pruebas realizadas y constituye el espacio académico necesario para la aplicación de los distintos mecanismos de las reacciones inmunológicas que se efectúan tanto en muestras biológicas como en animales de experimentación.



ÍNDICE

UNIDAD 1. INTRODUCCIÓN	Pp.
PRÁCTICA 01. ELABORACIÓN DE UNA VACUNA ANTIBACTERIANA.	04
PRÁCTICA 02. INMUNIZACION ARTIFICIAL ADQUIRIDA EN UN ANIMAL DE EXPERIMENTACIÓN: PRODUCCION DE UN ANTISUERO.	06
UNIDAD 2. PRECIPITACIÓN	
PRÁCTICA 03. TITULACIÓN DE PRECIPITINAS.	10
PRÁCTICA 04. INMUNODIFUSIÓN RADIAL SIMPLE.	12
PRÁCTICA 05. INMUNODIFUSION RADIAL DOBLE UTILIZANDO ANTISUERO DE CONEJO.	15
UNIDAD 3. HIPERSENSIBILIDAD	
PRÁCTICA 06. FENÓMENO DE ARTHUS.	18
UNIDAD 4. INMUNIDAD INNATA.	
PRÁCTICA 07. FAGOCITOSIS.	20
UNIDAD 5 AGLUTINACION	
PRÁCTICA 07. DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA SÍFILIS DETERMINACION DE V.D.R.L”	24
Práctica 08. REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN EN PLACA CON BACTERIAS (REACCIONES FEBRILES)”	26
PRÁCTICA 09. PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN PARA LA INVESTIGACIÓN DE LA HORMONA GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA.	31
UNIDAD 6 HEMÓLISIS	
PRÁCTICA 10. CRIOAGLUTININAS.	34
UNIDAD 7. PERFILES	
Práctica 11. PERFIL REUMATICO: PROTEINA C REACTIVA, FACTOR REUMATOIDE Y ANTIESTREPTOLISINAS.	36
UNIDAD 8. INMUNOENSAYOS	
PRÁCTICA 12. DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI VIH.	50

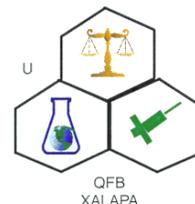


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



PRÁCTICA 13. DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE LA HEPATITIS B (HBSAG).	50
UNIDAD 9. INMUNOHEMATOLOGIA	
Práctica 14. DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO.	51
PRÁCTICA 15. DETERMINACIÓN DEL FACTOR RH.	56
PRÁCTICA 16. PRUEBAS CRUZADAS.	61
PRÁCTICA 17. PRUEBA DE COOMBS DIRECTA.	65
PRÁCTICA 18. PRUEBA DE COOMBS INDIRECTA.	68
ANEXO 1. PLAN DE MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICOS INFECCIOSOS.	70
ANEXO 2. MEDIDAS DE SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL.	82
ANEXO 3. BIBLIOGRAFÍA DE LA GUIA DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA.	85

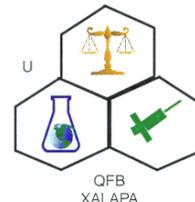


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



UNIDAD DE COMPETENCIA

El estudiante es capaz de aplicar los conocimientos y la metodología analítica actualmente utilizada para realizar distintos tipos de reacciones inmunológicas tanto in vivo como in vitro, además de que fortalezca las actitudes que le permitan el trabajo responsable tanto de manera individual como en equipo, con el fin de que pueda aplicarlos en el área de diagnóstico y en la preparación de productos biológicos.

ESTRATEGIAS METODOLÓGICAS

De aprendizaje	De enseñanza
<ul style="list-style-type: none">Exposición del profesorIntegración de grupos operativosDirección de actividadesModelaje para la ejecución de los métodos de laboratorio	<ul style="list-style-type: none">Búsqueda de información sobre el tema en diversas fuentes impresas y electrónicasResolución de preguntas guíaDiscusión en pequeños grupos y en sesión plenariaRealización de prácticas de laboratorioElaboración de reporte escrito de cada práctica

APOYOS EDUCATIVOS

Materiales didacticos	Recursos didacticos
<ul style="list-style-type: none">ManualCuestionariosAntologíaLibros de textoArtículos de revistas especializadasGuía del profesor	<ul style="list-style-type: none">PintarrónProyectorComputadora portátilSimuladorMaterial y Equipo necesario para desarrollar cada una de las prácticas

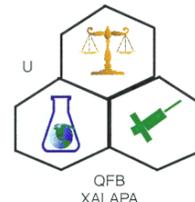


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA

FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA

MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora

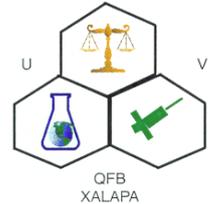


EVALUACION DE DESEMPEÑO

Evidencias de desempeño	Criterios de evaluación	Ámbito de desempeño	Calificación (%)
Realización de trabajo práctico o de investigación	Desarrollo de habilidades de ejecución. Comprensión de los métodos aplicados. Actitudes ante el trabajo individual y en equipo	Laboratorio	30
Discusiones grupales	Dominio de los temas tratados. Actitudes para el trabajo grupal	Laboratorio	20
Reportes de las prácticas	Puntualidad en la entrega Cumplimiento de especificaciones Pertinencia y actualidad de las fuentes de información consultadas	Laboratorio	20
Adquisición de conocimientos sobre aspectos teóricos	Respuesta adecuada	Laboratorio	30

ACREDITACIÓN

La calificación final de la experiencia educativa incluirá el desempeño del alumno tanto en el curso teórico como en el laboratorio de acuerdo con los siguientes porcentajes: Teoría con un 60% y Laboratorio con un 40%. **Siendo requisito indispensable obtener calificación aprobatoria en ambos.**



UNIDAD 1. PREPARACION DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS

GENERALIDADES

La Inmunidad adaptativa es la llevada a cabo por Células Presentadoras de Antígenos (CPA), linfocitos Th y linfocitos B. Adaptativo significa que se forma, que se adapta según la circunstancia, que se origina.

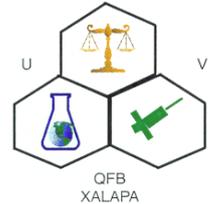
El inmunógeno puede tener diferentes vías de entrada. Ejemplos de vías podrían ser: las vías de las fosas nasales, vías de los sistemas digestivos, rectales, genitales, etc. Ejemplos de mecanismos podrían ser: mecanismo por aerosoles, por agua contaminada, por infección, por traumatismo, etc. y, de donde se adquiere la enfermedad o infección es la fuente de infección. Ej. La *Salmonella typhi* puede ser adquirida en un sorbete (éste es la fuente de infección); la *E. coli* de un hot dog (fuente de infección); etc.

Las vías de entrada de un inmunógeno pueden ser:

- Por el Torrente Sanguíneo: Todo inmunógeno generalmente que entra por esta vía es metabolizado, detectado y destruido en el BAZO.
- Por la piel: Todo inmunógeno que viene a través de la piel por un mecanismo traumático, primero inicia una inflamación local, llega a los canales linfáticos para posteriormente establecerse a los ganglios linfáticos donde se desencadena la respuesta inmune.
- Vía de entrada por Sistema respiratorio o Sistema digestivo: la respuesta inmune se ejerce a través de los tejidos linfoides tales como Amígdalas y Placas de Peyer. Tanto en el sistema respiratorio como en el sistema digestivo existe tejido linfoide.

Presentación de antígenos: Activación de la Célula Principal del Sistema inmune específico, Linfocitos T.

El linfocito T sólo es útil para el individuo que la posee. Es por eso que en algunos experimentos, a ratones de ciertas líneas puras se les ha sacado los linfocitos T y se les han metido a otros ratones de otra línea pura y no funcionan. A esto se le llama restricción. Esto conlleva a decir que los linfocitos T son ciegos inmunológicamente hablando, porque no reconocen nada si el antígeno no es procesado y presentado. Como todo lleva su jerarquía, las moléculas más simples, más grandes (pero no complejas) llegan hasta un cierto punto de reconocimiento. El linfocito T tiene a su cargo las moléculas más complejas; él procesa antígenos, pero además, es el regulador. Los antígenos pueden presentar diferente



complejidad y pueden ser de tres tipos:

- a) Timo independientes tipo I: aquellos antígenos que son LPS puros de bacterias.
- b) Timo independientes tipo II: aquellos antígenos con epitopos repetitivos lineales.
- c) Timo dependientes: su conformación es compleja (digamos proteínas) o antígenos monógenos grandes con muchas unidades repetitivas, pero complejas.

Ante la complejidad de los antígenos timodependientes, el linfocito T requiere que el antígeno le sea presentado y reconocido. Para eso se lo tienen que presentar en el contexto de los Antígenos de Histocompatibilidad (MHC), asociados a los Antígenos de Histocompatibilidad. Por esta razón es que la respuesta de los linfocitos T es restrictiva, porque los antígenos de histocompatibilidad son homólogos pero son propios. Existen diferentes células que van a tener la función de presentar a el antígeno, de metabolizar el antígeno. Generalmente son células fagocíticas y entre ellas la principal es el macrófago. Todas las líneas de los macrófagos principalmente son Células Presentadoras de Antígenos (CPA), como unas células principales que están en los ganglios: células dendríticas, las que están debajo de la piel y que van a ganglios: células de Langerhans y los linfocitos B.

Los inmunógenos a presentar pueden ser virus. Los virus, como tienen unidades repetitivas y son complejas, son inmunógenos complejos (timodependientes). Estos alertan, en contacto con el receptor, a la célula fagocítica. Se forma un fagosoma y luego éste se une a un lisosoma, a pH ácido, para degradar o metabolizar éste inmunógeno (lo procesan). Luego los epitopos se unen a los antígenos de histocompatibilidad. En este caso las células linfoides principalmente secretan Antígenos de Histocompatibilidad clase II (MHC II) y entonces a el antígeno lo asocian a moléculas de histocompatibilidad clase II (asociación = epitopos + MHC II) y luego lo presentan en la superficie. Al estar en la superficie ya puede ser reconocido por un LINFOCITO T HELPER (ver Figura 01).

Los TCR de los linfocitos T helper son estructuras que tienen funciones similares a los receptores de los linfocitos T, que también son receptores específicos que van a activar clonalmente a determinado linfocito Th, Esto sería principalmente una primera señal de la activación del linfocito T helper. Pero aún más, el macrófago o la Célula Presentadora de Antígeno inmediatamente secreta una citocina para darle la segunda señal de activación al linfocito T helper y es la Interleucina I (IL I). Entonces, las dos señales que nos van a activar a los linfocitos T helper o ayudador son: presentación del antígeno con MHC II y secreción de IL I (ver Figura 01). Con esto el linfocito comienza a activarse. Importante: no todos los epitopos van a participar aquí y no todos los linfocitos van a participar aquí; algunos participan, los de la misma línea.

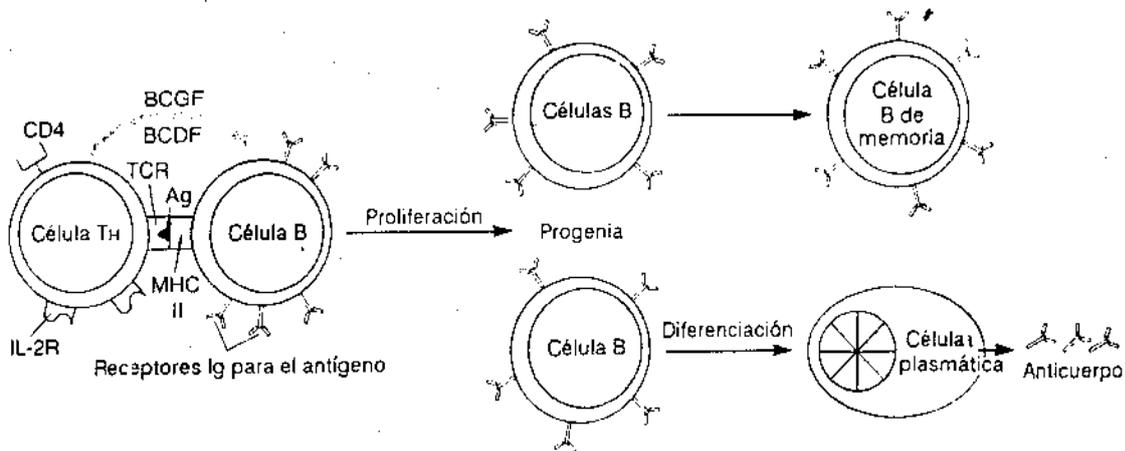
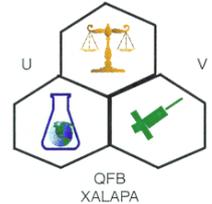
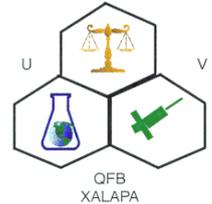


FIGURA 01: Estimulo inmune frente a un inmunógeno hasta la Producción de anticuerpos

El linfocito T ya activado empieza a producir o presentar en su superficie receptores para las siguientes interleucinas, que es la Interleucina II (IL II) la cual ha sido inducida por IL I. Entonces el linfocito Th secreta al medio la IL II con el objetivo de que ésta sirva como amplificadora de la respuesta inmune o de crecimiento (esto quiere decir que como ésta célula se ha activado se empieza a dividir clonalmente). Entonces la IL II es un factor de amplificación y un factor de crecimiento que forma miles y miles de linfocitos T igual a ellos. Además, libera otras citocinas: IL 3, Factor de Crecimiento de Células B (BCGF), IL 6, TNF, Interferones, etc. y esto hace que actúen otras células del sistema inmune con otras especificidades y funciones. A partir de esto es que se afirma que la respuesta inmune específica es heterogénea.

El linfocito B al entrar en contacto con inmunógenos complejos, tiene capacidad no de realizar una fagocitosis sino en realidad una endocitosis; al hacer esto, el linfocito B procesa a dicho antígeno muy complejo y luego lo presenta a linfocito T inductor, en el contexto siempre de Antígenos de Histocompatibilidad clase II (MHC II). Esto lo hace porque el linfocito B está como "pidiendo el auxilio" o "ayuda" al linfocito T. Luego, el linfocito T le descarga 2 citocinas: (1) Factor de Crecimiento de Células B (BCGF o "B-cell growth factor"), para que esa célula se clone; (2) Factor de Diferenciación de Células B (BCDF o "B-cell differentiation factor"), para que el linfocito B se diferencie en célula plasmática, que es la que principalmente va a producir o secretar los Anticuerpos Específicos. El linfocito B va a producir, en su progenie, tanto células de memoria como células plasmáticas. Las células de memoria probablemente se producen porque no se alcanza, para una célula, la suficiente concentración de Factor de diferenciación de células B o BCDF y, en vez de transformarse a células plasmáticas, se quedan como células B de



memoria.

Laboratorio de Inmunología
Práctica 01
“ELABORACIÓN DE UNA VACUNA ANTIBACTERIANA”
Duración: 08 hr

OBJETIVO:

Que el estudiante elabora una vacuna antibacteriana, establezca controles de esterilidad.

INTRODUCCIÓN

Se fundamenta en aislar y obtener un microorganismo completamente puro mediante diversos cultivos del microorganismo, logando que éste pierda su patogenicidad sin perder su antigenicidad.

PRINCIPIO TEORICO

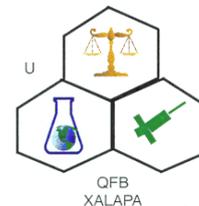
Si una bacteria es inoculada a un animal, este estimula su sistema inmune y como resultado forma una diversidad de anticuerpos contra la sustancia inoculada. Esto es debido a que los microorganismos son considerados como verdaderos sacos antigénicos con gran capacidad inmunógena. Las bacterias son especialmente inmunogénicas para los mamíferos, por lo tanto, cualquier inmunización con éstas reactivara el sistema inmune de éstos y se crearan anticuerpos que posteriormente in Vitro podrán ser identificados cuando se les ponga en contacto nuevamente con la bacteria (inmunógeno), se llevará a cabo una reacción antígeno-anticuerpo visible, y capaz de identificar la creación de anticuerpos.

EQUIPO:

Estufa de incubación
Baño de agua
Centrífuga
Microscopio
Refrigerador a 4°C

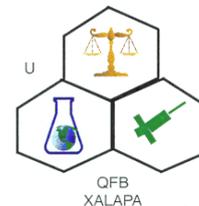
MATERIAL:

- a) Biológico: Cepas de Escherichia coli
- b) De Laboratorio:
 - Tubos de ensayo de 13 x 100 con tapón de rosca
 - Cajas Petri de plástico o vidrio
 - Pipetas graduadas (1, 5, 10 ml)
 - Gradilla
 - Mechero
 - Portaobjetos
 - Agar simple
 - Solución salina isotónica esteril
 - Asa para siembra
 - Colorantes para tinción de Gram
 - Aceite de inmersión



TÉCNICA:

1. Sembrar la cepa elegida para el experimento en caldo simple e incubar a 37 grados centígrados, durante 24 horas.
2. Del tubo que contiene el cultivo liquido sembrar en dos cajas Petri con agar simple en estría e incubar a 37 grados centígrados durante 24 horas.
3. Escoger las colonias individuales desarrolladas en las cajas de cultivo y sembrar en 5 tubos con agar simple inclinado, durante 24 horas e incubar a 37 grados centígrados.
4. Revisar meticulosamente el cultivo y agregar a cada tubo solución salina isotónica estéril, hacer extensiones en portaobjetos y teñir con Gram, observar posteriormente el cultivo y este deberá presentar las características tintoriales de la bacteria utilizada.
5. Si las bacterias tienen la pureza esperada, se desprende todo el cultivo del agar y se pasa la suspensión bacteriana a tubos de 13x100 con rosca estériles y colocar en baño de agua a 55 grados centígrados durante 3 horas mezclando regularmente.
6. Una vez terminada esta etapa sembrar de cada tubo a otro con agar simple inclinado y esperar de 48 a 72 verificando que no haya crecimiento bacteriano en los tubos, lo que indicará que estos están muertos.
7. Una vez confirmada la muerte bacteriana, suspender el cultivo con solución salina a una turbidez que equivale a 10^9 /ml y agregar solución fenolada estéril sin alterar la concentración anterior.
8. Nuevamente sembrar a tubos con agar inclinado de la suspensión obtenida en el paso anterior y esperar 7 días a que no se desarrolle ningún crecimiento, y guardar en refrigeración en condiciones de esterilidad las suspensiones obtenidas en viales con tapón de hule selladas.
9. Si la esterilidad es confirmada se pueden utilizar para la inoculación de los animales elegidos.



Laboratorio de Inmunología
Práctica 02

**“INMUNIZACION ARTIFICIAL ADQUIRIDA EN UN ANIMAL DE
EXPERIMENTACIÓN: PRODUCCION DE UN ANTISUERO”**

Duración: 04 hr

OBJETIVO:

Que el estudiante genere un suero inmune a través de la verificación de una reacción de aglutinación, lo cual indicará el título de anticuerpos presentes en el suero del conejo inmunizado.

MATERIAL:

- Jeringas de 1, 3, 5, 10 y 20 cc
- Agujas hipodérmicas número 22 y 25 con bisel corto
- Aguja hipodérmica número 18 con bisel largo
- Báscula para conejo
- Termómetro
- Tijeras
- Rastrillo
- Algodón
- Mechero
- Gradilla
- Tubos de vidrio de 13 y 100
- Tubos de polipropileno de 10 x 75 ó 13 x 100

TÉCNICA

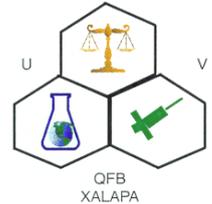
1.- Pesar al conejo en la báscula especial, para la inmunización deberá pesar de 2.5 a 3 Kg.
2.- Inmunizar un conejo vía intravenosa con albúmina diluida 1:2 con sol. Salina estéril y otro con la vacuna bacteriana obtenida de la practica anterior, utilizando las venas de la zona marginal de las orejas del conejo que se encuentran en el borde externo de la oreja, iniciando las inoculaciones en la zona más distal a la cabeza para que la cicatrización no impida las subsiguientes inoculaciones utilizando una jeringa para insulina (1cc con aguja del 25 con bisel corto), siguiendo el siguiente calendario de inoculaciones:

1. Conejo de 2.5 a 3.0 Kg de peso.
2. Realizar inoculaciones intravenosas utilizando un antígeno bacteriano preparado en la práctica 6.1. y 6.2.
3. Seguir el siguiente calendario de inoculaciones:
1er día ----- 0.1 cc de antígeno
4º día ----- 0.3 cc de antígeno
8º día ----- 0.5 cc de antígeno
11º día ----- 1.0 cc de antígeno
15º día ----- 2.0 cc de antígeno



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



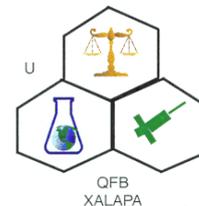
18° día sangrado

El sangrado se llevará a cabo punzando el corazón en el espacio intercostal entre la segunda y tercera costilla. Se utilizará una jeringa de 20 mililitros con aguja de calibre grueso (número 18).

Una vez aplicada la anestesia por vía intravenosa, y siguiendo las instrucciones del fabricante de la anestesia general, esperar a que el animal tenga signos de inconciencia lo que se observa cuando este se desvanece. Inmediatamente recostarlo boca arriba y tomar las patas por cada extremo (esto lo harán dos personas), una persona limpiara la zona del corazón (costado superior izquierdo) con abundante alcohol puro y una vez realizado este procedimiento se colocará una tira de madera entre los dientes del animal procurando que la lengua salga de la boca y no sea mordida por el animal. Checar sus signos vitales y si ya no responde punzar el órgano cardiaco con la jeringa y aguja, cuando la sangre se ve en la punta de la aguja aspirar lentamente y una vez obtenida la sangre, sacar la aguja y poner una torunda bien exprimida en la zona de la punción y presionar durante unos cinco minutos con el conejo puesto de lado contrario con la cabeza recostada sobre una almohada baja y cubrir al animal. Checar constantemente sus signos vitales.

La sangre se depositará en tubos de ensayo de 13x100 y una vez coagulada la sangre se procederá a centrifugar para separar el suero.

Los dos conejos serán tratados de igual forma y en el que se ha inoculado con la vacuna bacteriana tendremos un anticuerpo contra la bacteria y el conejo inoculado con ovalbúmina se tendrá un antisuero contra esta proteína, depositar el suero en tubos de polipropileno y congelar, este antisuero se utilizará para la titulación de aglutininas y precipitinas y prácticas de precipitación en gel.



UNIDAD 2. **PRECIPITACIÓN**

GENERALIDADES

La precipitación es la reacción que ocurre entre un antígeno soluble y un anticuerpo también soluble, en la cual se forma una malla compleja de conjuntos entrelazados. Esta reacción ocupa una importante posición en la inmunología y se produce cuando un antisuero es mezclado con un antígeno inmunizante.

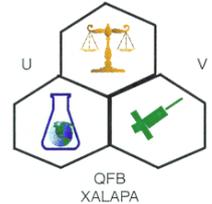
Existen distintas aplicaciones de la reacción de precipitación como procedimiento importante en inmunoquímica para la identificación y cuantificación de un amplio grupo de sustancias antigénicas. Cada una de las formas de aplicación de las técnicas de precipitación tiene una ventaja distinta de sensibilidad, especificidad y simplicidad. Los límites de sensibilidad de estos análisis son también de la mayor importancia, incluso en las mejores condiciones de sensibilidad acrecentadas ofrecidas por las nuevas técnicas de luz difusa, la exactitud y sensibilidad en los análisis de inmunoprecipitación no son satisfactorias por debajo de uno valores de 0.1 a 0.5 mg/dl.

Entre algunos factores que afectan la reacción de precipitación, se encuentran la temperatura, el pH y la reactividad de los anticuerpos. En algunas condiciones de los reactantes, el precipitado se forma igualmente bien a 0°C que, a 37°C, sin embargo, en muchos antisueros, se encuentra una mayor reactividad específica a una determinada temperatura que a otras.

La concentración de sales en el medio reactante, generalmente como concentración de cloruro sódico, muestra un efecto sustancial en la formación de complejos inmunes en la reacción de precipitación. Grandes cantidades de sal parecen aumentar la solubilidad de los complejos y causan una desviación del equilibrio entre los reactantes, de modo que tiene lugar una disociación de los complejos formados y se evita la formación de nuevos complejos.

El pH parece tener un efecto en el que los complejos inmunes parecen formarse más en la zona neutra entre 6 y 7.5, mientras que niveles más altos o bajos de pH pueden disociar o impedir la formación de los complejos. La sensibilidad, simplicidad y especificidad de la reacción de precipitación, constituye la base de su importancia como técnica analítica en el laboratorio clínico. Durante la precipitación, el antígeno de una molécula soluble, por lo tanto, debe formarse una red bastante grande antes de que pueda verse el agregado.

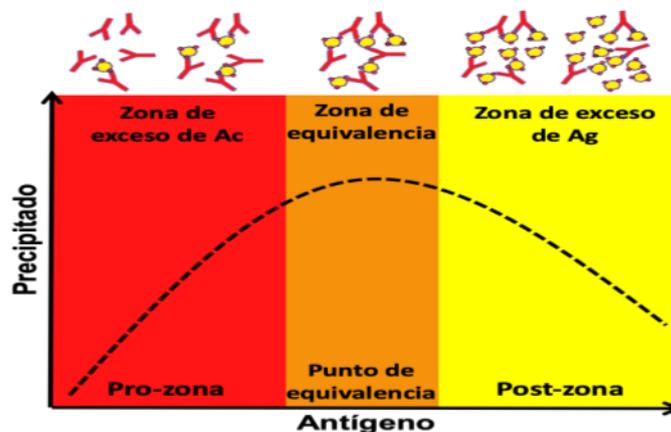
En un principio no se forma precipitado, al aumentar la cantidad de antígeno, el precipitado se va haciendo mayor, hasta llegar a un máximo. Si se sigue añadiendo antígeno, vuelve a disminuir la cantidad de precipitado hasta finalmente desaparecer. En la primera etapa de la reacción, existe un exceso relativo de anticuerpo; en la molécula de anticuerpo,



los dos focos de combinación con antígeno pueden reaccionar con sendas moléculas. Aparecen aquí complejos formados por un anticuerpo y dos antígenos. Como los anticuerpos IgG poseen solo dos focos de combinación, no queda ningún otro para fijar más antígeno y es imposible la formación de una red continua que dé lugar a precipitación. En el líquido sobrenadante no hay antígeno libre.

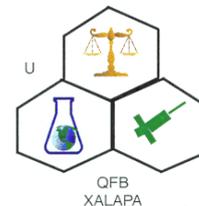
En la zona media, las concentraciones de antígeno y anticuerpo son óptimas. Esta zona se ha llamado región de proporciones óptimas o punto de equivalencia. Las concentraciones relativas de antígeno y anticuerpo son tales que la precipitación es máxima. Si se examinan los líquidos sobrenadantes después de quitar los precipitados, se ve que no quedan en ellos ni anticuerpos ni antígenos libres.

La zona de la derecha se llama región del exceso del antígeno. La formación de precipitado es escasa, aunque vuelve a encontrarse antígeno libre en el líquido sobrenadante. En estas condiciones, el anticuerpo es insuficiente para combinarse con todos los focos receptores del antígeno. El estudio del líquido sobrenadante muestra la presencia de un exceso de antígeno libre. En la siguiente figura, se muestra la curva cuantitativa de precipitación, dividida en las zonas antes descritas:



OBJETIVO GENERAL

Conocer los factores y conceptos fisicoquímicos, que influyen en los mecanismos de precipitación.



Laboratorio de Inmunología
Práctica 03
“TITULACIÓN DE PRECIPITINAS”
Duración: 04 hr

INTRODUCCION

Se basa en la reacción entre un Antígeno soluble y su Anticuerpo, se forma una reacción de identidad que permite la formación de una malla compleja con gran peso que precipita.

PRINCIPIO TEORICO

La obtención de precipitinas se realiza mediante la reacción inmune que presenta el conejo al inocularse el antígeno elegido, en este caso ovoalbúmina, el cual provoca que el sistema inmune del animal, produzca anticuerpos contra dicho antígeno. Esto se logra con inoculaciones seriadas del mismo. Se debe tomar precauciones a partir de la segunda inoculación del antígeno, ya que puede presentarse el shock anafiláctico.

Los anticuerpos que participan en la precipitación se denominan precipitinas. La unión del antígeno y el anticuerpo que precipitan tienen a permanecer suspendidos en la solución por lo que es necesario centrifugar para observar la reacción. Se mezclan los anticuerpos con el antígeno este último en cantidades constantes con diluciones seriadas del suero, de tal forma que la reacción positiva se toma hasta el último tubo donde aparece el precipitado, lo que se denomina título de precipitinas.

OBJETIVO:

Obtener mediante inmunización directa precipitinas y realizar su titulación.

MATERIAL

- Tubos de 13 x 100
- 4 pipetas graduadas de 1 ml
- 4 pipetas graduadas de 5 ml

MATERIAL BIOLÓGICO:

- Antisuero de conejo contra ovoalbúmina

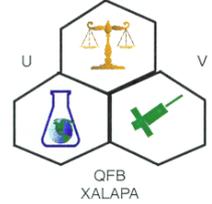
REACTIVOS:

- Ovoalbúmina
- Alcohol etílico
- Solución salina fisiológica estéril

TÉCNICA:

TITULACIÓN DE PRECIPITINAS

1.- Prepare diluciones del antígeno con solución salina fisiológica de la siguiente manera:



Dilución	Ovoalbúmina	Solución salina
1:10	0.5 ml	4.5 ml
1:100	0.5 ml de dilución 1:10	4.5 ml
1:300	0.5 ml de dilución 1:100	1.0 ml
1:500	1.0 ml de dilución 1:100	4.0 ml
1:1 000	1.0 ml de dilución 1:500	1.0 ml
1:1 500	1.0 ml de dilución 1:500	2.0 ml
1:2000	1.0 ml de dilución 1:1000	1.0 ml
1:3000	1.0 ml de dilución 1:1500	1.0 ml
1:4000	1.0 ml de dilución 1:2000	1.0 ml
1:6000	1.0 ml de dilución 1:3000	1.0 ml
1:8000	1.0 ml de dilución 1:4000	1.0 ml
1:12000	1.0 ml de dilución 1:6000	1.0 ml

2.- Prepare 12 tubos de hemólisis en una gradilla de metal, perfectamente limpia y seca. Agregue a cada uno de ellos 0.25 ml de cada una de las diluciones del antígeno y 0.25 ml del antisuero sin diluir. Mezclar y agitar los tubos durante 5 minutos, incubar a 55 grados centígrados durante 15 minutos y observar macroscópicamente, centrifugar durante 5 minutos a 2,500 rpm, observar la precipitación y anotar la última dilución donde se presenta como el título de precipitinas.

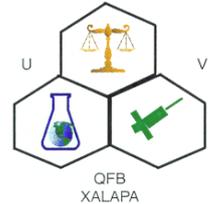
INTERPRETACIÓN

La máxima dilución del antígeno que precipita con el anticuerpo es el título de precipitinas.



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



Laboratorio de Inmunología
Práctica 04
“INMUNODIFUSIÓN RADIAL SIMPLE”
Duración: 04 hr

INTRODUCCION

La inmunodifusión radial simple se basa en las reacciones de precipitación de tipo difusión simple, que se produce cuando se incorpora uno de los componentes, por lo común el anticuerpo, dentro de un gel de agar, mientras el otro componente, el antígeno, se introduce en un orificio dentro del gel. Posteriormente, el antígeno difunde radialmente desde el pozo central. Donde se une el antígeno con su cuerpo correspondiente en el agar, aparece la precipitación.

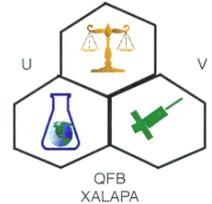
Después de que ha terminado la reacción o de un lapso fijado, se forma un borde o anillo neto. Por dilución seriada de una cantidad conocida estándar de antígeno, se forman anillos de tamaño decreciente. La cantidad del antígeno en las muestras desconocidas puede ser calculada y comparada con el estándar en el periodo determinado.

PRINCIPIO TEORICO

La difusión ocurre de forma radial comenzando desde el orificio. La inmunodifusión radial simple permite cuantificar diversos anticuerpos. Así, para averiguar que cantidad que cantidad de inmunoglobulinas G, M o A por ejemplo, existen en un suero, bastará depositar una cantidad determinada de dicho suero en orificios practicados en placas de agar que contengan antiglobulinas G, M o A en este orden.

De acuerdo con los principios de la difusión, en diámetro del halo de precipitación está en relación directa con la concentración antigénica. La sensibilidad del método de inmunodifusión radial es aproximadamente 1mg, de proteína por decilitro; el límite de sensibilidad depende básicamente de la capacidad para ver y medir precipitados antígeno-anticuerpo. Hallazgos erróneos pueden resultar de un manejo inapropiado de las placas. Anillos de precipitina distorsionados pueden producirse a consecuencia de un corte en el pocillo o de una caja desnivelada de gel agar. El derrame de antígeno fuera del pocillo, o diferentes periodos de incubación para estándares y muestras, también crearían un error; un exceso de antígeno podría llevar a una conclusión falsa de ausencia de antígeno debida a la formación de un anillo de precipitina grande y en realidad antígenos agregados o disociados también dan falsos valores de concentración.

La concentración de inmunoglobulina en el suero depende principalmente de la edad del individuo y en menor grado del sexo, la raza y la ubicación geográfica. En el caso de trabajar en el laboratorio con muestras pediátricas deben usarse niveles apropiados de inmunoglobulina relacionados con la edad, y si es posible, determinar sus propios límites



normales de concentraciones de inmunoglobulina que reflejen las diferencias por ubicación geográfica y por raza. En la precipitación en gel, al introducir el antígeno y anticuerpo en el medio gelatinoso en puntos diferentes, difunden y forman precipitados en el punto en el que se encuentran, cuando la proporción entre concentraciones de antígeno y anticuerpo se presentan a ello. En la precipitación en medio líquido, el precipitado se forma en el plano en el que se encuentran el antígeno y el antisero, estos no difunden.

OBJETIVO:

Conocer el empleo de la precipitación en gel, mediante la técnica de inmunodifusión radial simple, y la diferencia con la precipitación en medio líquido.

TÉCNICA:

1.- Extraiga 2 ml de sangre, colóquela en un tubo y déjela coagular; centrifugue y separe el suero en otro tubo.

2.- Coloque 5 ul de suero control en uno de los pozos de la placa y 5 ul del suero problema en otro pozo, anotando el número que le corresponda a cada uno de ellos. Cerrar la placa y dejarla a temperatura ambiente. Esta operación se realiza con cada placa, tanto de IgG, como IgA e IgM, y con los sueros control correspondientes.

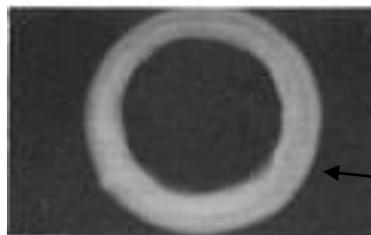
3.- Dejar en reposo durante el siguiente tiempo:

para IgG	48 horas
para IgM	80 horas (mínimo)
para IgA	48 horas

4.- Al cabo de este tiempo, medir los diámetros de los halos de precipitación tanto de los sueros control como de los sueros problema y obtener la concentración de las inmunoglobulinas en la tabla correspondiente.

INTERPRETACIÓN:

Desde el comienzo de la difusión del antígeno se forma un complejo antígeno-anticuerpo, después de suficiente tiempo de difusión, por llegar a la zona de equivalencia, se alcanza el punto final de difusión. En el punto final de difusión, el área del anillo de precipitación es directamente proporcional a la concentración de antígeno.

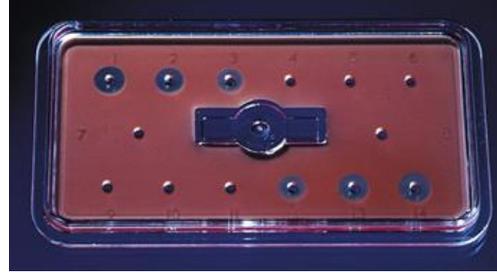
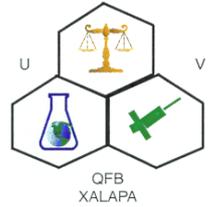


RESULTADO POSITIVO

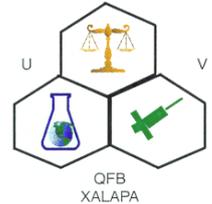


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



PLACAS COMERCIALES DE PRECIPITACION SIMPLE



Laboratorio de Inmunología
Práctica 05
“INMUNODIFUSION RADIAL DOBLE
UTILIZANDO ANTISUERO DE CONEJO”
Duración: 04 hr

OBJETIVO:

Que el estudiante logre la formación de una banda de precipitación indicativa de que tanto el antígeno como el anticuerpo se unieron en la capa de agar y así lograr una inmunodifusión radial doble.

MATERIALES:

EQUIPO:

Centrifuga
Autoclave
Campana de flujo laminar

MATERIAL:

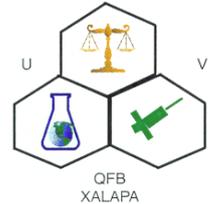
Cajas Petri esteriles
Micropipeta de 20 ul
Horadador de 2-3 mm
Perilla de huele
Cubre bocas
Pipeta de 10 ml esteril
Mechero

REACTIVOS:

Suero antihumano
Albumina bovina 22%
Antisuero de conejo antiovoalbúmina

TÉCNICA:

- 1.- Extraer 15 ml de sangre por punción cardíaca a un conejo previamente sensibilizado con ovoalbúmina. Colocar la sangre en un tubo limpio, seco y estéril (todo el material de esta práctica se debe esterilizar).
- 2.- Dejar coagular la sangre a temperatura ambiente.
- 3.- Separar el coagulo con palillos de madera estériles y centrifugar a 2,500 rpm durante 10 minutos.
- 4.- Separar el suero en otro tubo con ayuda de una pipeta Pasteur.
- 5.- Adicional 2 ml de suero en una caja petri y 15 ml de agar (1.2 g/dl). El suero debe ser distribuido en toda la caja; debe dejar solidificar. Para mejor solidificación, refrigerar las cajas 10 minutos.
- 6.- Después de solidificado, perforar pozos en el agar con el tubo de vidrio y la perilla de la siguiente manera: colocar un extremo del tubo en la perilla, desechar el aire de la perilla e introducir en el agar el tubo de vidrio y extraer lo que queda de agar en el tubo; retirar con



cuidado la punta del tubo de vidrio para no rasgar el agar. Se deben perforar 8 pozos (Trabajar en la campana de flujo laminar).

7.- Preparar las siguientes diluciones de ovoalbúmina con solución salina 1:2, 1:4, 1:6, 1:8, 1:10, 1:12 y 1:14. Colocar cada dilución en matraces de 50 ml.

8.- Colocar en cada pozo con una pipeta de 5 ul, las diferentes diluciones de ovoalbúmina, siguiendo el orden de las manecillas del reloj. En el primer pozo, colocar ovoalbúmina sin diluir.

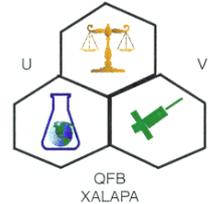
9.- Colocar en la tapa de la caja petri, un papel filtro impregnado con merthiolate al 10%, para evitar contaminación.

10.- Dejar la caja petri en reposo, durante 24 a 48 horas.

11.- Observar los resultados con luz directa.

INTERPRETACIÓN:

La formación del anillo de precipitación, indica la presencia del anticuerpo específico al antígeno utilizado, en este caso, el antígeno (ovoalbúmina) difunde en forma radial por el anticuerpo anti-ovoalbúmina presente en el suero del conejo.



UNIDAD 3. HIPERSENSIBILIDAD

GENERALIDADES

La hipersensibilidad es en ciertos aspectos, una disminución de la respuesta inmune; en otro, es una exageración de esta. Se conocen dos tipos principales de hipersensibilidad, la inmediata y la tardía.

En la respuesta inmediata, la combinación de antígeno-anticuerpo, de una forma u otra, lesiona células, que a su vez liberan sustancias como la histamina que producen constricción bronquial, urticaria, cefalea y otros síntomas. Se conocen clínicamente, distintas variedades de esta respuesta inmediata, algunos ejemplos de respuesta inmediata son: el choque anafiláctico y la enfermedad del suero (en algunos casos).

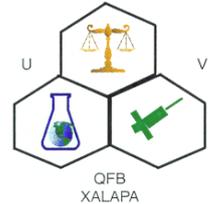
La hipersensibilidad tardía se presenta varias horas después del contacto con el antígeno, pero difiere de la respuesta inmediata en un aspecto mucho más fundamental. En este tipo de hipersensibilidad, no se encuentra anticuerpo circulante demostrable, y la hipersensibilidad no puede ser transferida por administración pasiva de suero hipersensible de una persona sensibilizada a un sujeto normal. Sin embargo, es posible transferir esta sensibilidad administrando las células del individuo hipersensible a un sujeto normal. En este tipo de respuesta, no hay liberación de histamina.

La hipersensibilidad es con seguridad, una indicación clínica de infección presente o antigua, y de cierto tipo de inmunidad. Las respuestas cutáneas frente a fármacos de aplicación local, colorantes para el pelo y algunos metales (armazón de gafas), representan una variedad de hipersensibilidad tardía, y algunas de estas sustancias pueden actuar como haptenos, conjugados a proteínas corporales, para manifestar su antigenicidad.

La hipersensibilidad tardía a productos químicos se induce por contacto cutáneo. El conjugarse la sustancia química con las proteínas de la piel, se produce el complejo antígeno. Los anticuerpos no pueden ser demostrados, se cree que son estrictamente intracelulares, y que son los responsables de la reacción.

OBJETIVO GENERAL

Que el alumno observe los fenómenos causados por reacciones de hipersensibilidad durante las inmunizaciones efectuados en el laboratorio en el hombre y los conejos.



Laboratorio de Inmunología
Práctica 06
“FENÓMENO DE ARTHUS”
Duración: 01 hr

OBJETIVO:

Conocer el fundamento de la reacción de Arthus, así como sus consecuencias inmunológicas y físicas.

INTRODUCCION

El principio de la reacción de Arthus, consiste en la precipitación de un antígeno (inyectado debajo de la piel) por su anticuerpo, en la pared de los vasos cutáneos de animales que elaboran anticuerpos precipitantes. También se puede provocar una reacción de Arthus pasiva: directa, cuando se inyecta el antígeno debajo de la piel y el anticuerpo por vía venosa; o indirecta, cuando el anticuerpo es que se inyecta debajo de la piel y el antígeno por vía venosa.

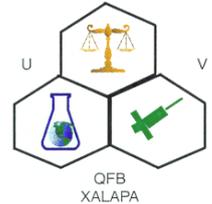
En la sangre circulante se encuentran abundantes anticuerpos precipitantes, al unirse éstos anticuerpos de clase IgG, con las elevadas concentraciones de antígeno en los tejidos, se produce la lesión con la participación del complemento; se forman complejos solubles entre antígenos y anticuerpos circulantes, acumulándose estos microprecipitados alrededor de los vasos sanguíneos pequeños. Su acción irritante provoca una efusión de leucocitos polimorfonucleares que fagocitan los complejos antígeno-anticuerpo. Se liberan enzimas proteolíticas, se acumulan plaquetas, se forman coágulos en la sangre, se destruyen las paredes vasculares y sobreviene una necrosis hemorrágica del tejido.

PRINCIPIO TEORICO

La reacción de Arthus es una reacción necrótica de hipersensibilidad semiretardada, provocada por polimorfonulceares atraídos y activados a nivel de los complejos inmunes.

La fase inicial en la patogenia de la reacción es la respuesta primaria, provocada por la primera inyección del antígeno. Cada inyección posterior provoca respuestas secundarias, haciendo aparecer concentraciones crecientes de anticuerpos contra el antígeno en el suero.

Se ha demostrado la presencia de complejos antígeno-anticuerpo-complemento en las paredes de los vasos sanguíneos afectados. Como es raro administrar sustancias fuertemente antigénicas en inyecciones subcutáneas repetidas, la reacción de Arthus es de poca importancia clínica. El valor radica en poder realizar la reacción en modelos animales para dilucidar los mecanismos de daño tisular por complejos antígeno-anticuerpo en ciertas enfermedades humanas.



DESCRIPCION

MATERIAL:

- Jeringa de 3 ml
- Agujas hipodérmicas del número 23 y 25
- Algodón
- Tijeras
- Rastrillo con navaja
- Jabón

MATERIAL BIOLÓGICO:

- Conejo inmunizado con ovoalbúmina

REACTIVOS:

- Ovoalbúmina (clara de huevo)
- Solución salina fisiológica estéril

TÉCNICA:

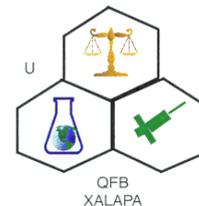
- 1.- Se utiliza en este experimento un conejo previamente sensibilizado a la ovoalbúmina.
- 2.- Trasquilar con las tijeras lo mejor posible los pelos de la pierna del conejo, rasurar cuidadosamente y frotar vigorosamente con alcohol.
- 3.- En el lugar seleccionado para la inoculación se levanta la piel y se introduce la aguja número 25 con el bisel hacia abajo en el espacio vacío. Se inoculan 2 ml del antígeno quedando una bolita que no se debe frotar; el antígeno debe quedar sobre el músculo.
- 4.- Observar a las 24, 48 y 72 horas si se produjo necrosis o enrojecimiento de la zona.

INTERPRETACIÓN:

La unión de los anticuerpos presentes en el animal inmunizado con las elevadas concentraciones del antígeno inoculado (ovoalbúmina), da lugar a una lesión con participación del complemento, y se forma precipitación. Visiblemente, esto se puede observar en la zona de la inoculación, por necrosis producida.



FENOMENO DE ARTHUS POSITIVO



UNIDAD 4. INMUNIDAD INNATA

Laboratorio de Inmunología Práctica 07 “FAGOCITOSIS” Duración: 02 hr

OBJETIVO

Comprender el proceso de la fagocitosis in vitro y aplicar los conocimientos teóricos de inmunidad natural.

INTRODUCCIÓN

En la fagocitosis (el equivalente a comer celular), la célula engulle desechos, bacterias u otros objetos grandes. La fagocitosis se lleva a cabo en células especializadas llamadas fagocitos, donde se incluyen los macrófagos, neutrófilos y otros glóbulos blancos de la sangre. La invaginación produce una vesícula llamada fagosoma, la cual usualmente se fusiona con uno o más lisosomas conteniendo enzimas hidrolíticas. Los materiales en el fagosoma son rotos por estas enzimas y degradados.

FUNDAMENTO TEORICO

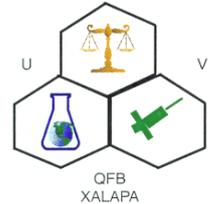
En función del tipo de vesículas que se forman, se pueden distinguir dos tipos de endocitosis:

- **Pinocitosis:** ("bebida de la célula"), que implica la ingestión de fluidos y de solutos vía pequeñas vesículas (≈ 150 nm de diámetro).
- **Fagocitosis:** ("comida de la célula") que comporta la ingestión de grandes partículas tales como microorganismos o restos celulares, mediante grandes vesículas llamadas **fagosomas** (≈ 250 nm de diámetro superior).

Aunque la mayoría de las células eucarióticas ingieren continuamente fluidos y solutos por pinocitosis, las grandes partículas son ingeridas principalmente por células fagocíticas especializadas.

Etapas de la fagocitosis:

Pasaje de células al torrente sanguíneo Se inicia con la adherencia de células al endotelio vascular. Las células irán al lugar de la amenaza. Estas son células especializadas, que pueden ser macrófagos o linfocitos. Los mismos serán estimulados para que produzcan citoquinas (IL-1, TNF, IFN).



Quimiotaxis Es la etapa de movilización y reclutamiento de leucocitos, por medio de interacciones celulares, a la zona o tejido lesionado. El fagocito se adhiere levemente a la superficie del endotelio (previamente activado por las citocinas), a través de uniones moleculares de baja afinidad entre receptores en el leucocito y selectinas sobre la superficie endotelial (selectina E y selectina P, por ejemplo).

El flujo sanguíneo laminar empuja a los leucocitos así adheridos en dirección de la corriente sanguínea. El fagocito se despega de las interacciones corriente-arriba y sus ligandos de membrana se unen a nuevas selectinas corriente-abajo. El resultado es un movimiento neto a lo largo de la superficie endotelial. Otras moléculas que participan en esta movilización son las moléculas de adhesión vascular (VCAM-1) presentes en el endotelio, cuyos ligandos correspondientes muestran preferencia por los linfocitos T y eosinófilos.

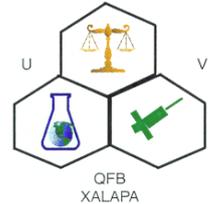
En un punto específico, determinado por la presencia y activación de quimiocinas, los fagocitos movilizados establecen interacciones intercelulares de gran afinidad con el endotelio por medio de integrinas y otros ligandos endoteliales. En especial las moléculas endoteliales LFA-a, CR3 y VLA-4 se adhieren a ligandos específicos sobre los fagocitos, entre ellos VCAM-1 e ICAM-1. La expresión de estos ligandos sobre la superficie del fagocito es regulada por proteínas inflamatorias, como el TNF y la IL-1.

Es en ese punto de movilización lenta cuando los fagocitos, atraídos por gradientes de concentración de las quimiocinas, atraviesan el epitelio vascular hacia el foco de infección patógena.

Adherencia Otros receptores sobre la membrana de los leucocitos y otros fagocitos actúan como mecanismos de adherencia sobre los microorganismos, sea a productos microbianos específicos o sobre opsoninas del sistema inmune del hospedador.

- Receptor de manosa. Este receptor tiene afinidad por los componentes de manosa presentes en las glucoproteínas y glucolípidos de las paredes celulares microbianos.
- *Scavenger*. Estos receptores se unen directamente a microorganismos y a moléculas de LDL modificadas.
- CD14. Es un ligando con preferencia específica al lipopolisacárido presente en ciertas bacterias y está asociado a un receptor tipo *Toll*.
- Transmembrana de 7 helices alfa. Es un receptor recientemente descubierto, cuya función está asociada a señales de quimiocinas y ciertos péptidos microbianos.
- Receptores para los fragmentos Fc de los anticuerpos opsonizantes IgG2 e IgG3.

Ingestión La unión a receptores de adherencia promueve señales de comunicación intracelular que resultan en la evaginación de la membrana del fagocito rodeando al receptor y su ligando patogénico. Al rodear por completo al complejo receptor:molécula, la membrana se une en sus extremos y libera al interior de la célula un fagosoma. Esto puede ocurrir en más de un punto de la membrana celular.



Digestión Una vez que el fagosoma está en el citoplasma comienza la desintegración de este, proceso que se realiza por mecanismos dependientes o independientes de Oxígeno. El primero se da tras activarse rutas metabólicas que consumen oxígeno, lo cual produce la liberación de radicales libres del oxígeno, que son tóxicos para los microorganismos. En el segundo caso es donde intervienen los lisosomas, los cuales se unen al fagosoma conformando un fagolisosoma, y liberando enzimas hidrolíticas que destruirán al antígeno.

Excreción: En el proceso de digestión queda una vesícula que contiene desechos, o el mismo antígeno (Dado que no siempre puede ser desintegrado), por lo que esto debe estar fuera de la célula para traer futuros inconvenientes. Entonces, la forma de deshacerse de estos residuos es mediante la exocitosis. Un ejemplo de esto se da cuando esputamos (o tosemos), dado que lo que estamos haciendo en verdad es deshacernos de células que contienen un antígeno que no pueden degradar. Dichas células son los macrófagos alveolares, que al entrar una partícula exógena y no poder degradarla se vuelven una amenaza para el organismo, por lo que es conveniente deshacerse de ella.

TAREA: OBSERVAR LA FAGOCITOSIS IN VIVO EN LA SIGUIENTE DIRECCIÓN ELECTRÓNICA ANTES DE LA REALIZACIÓN DE LA PRÁCTICA EN EL LABORATORIO:

<http://elezeta.net/2008/10/04/fagocitosis-de-un-neutrofilo-un-globulo-blanco-persiguiendo-a-una-bacteria/>

MATERIAL:

1. El indispensable en un laboratorio de Microbiología
2. Incubadora a 37° C
3. Portaobjetos
4. Termómetro
5. Microscopio
6. Pipetas Pasteur con bulbo

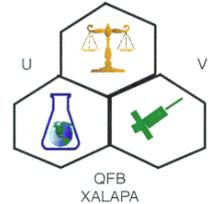
REACTIVOS

1. Serie tinción de Gram
2. Colorante de Wright
3. Buffer Wright

MATERIAL BIOLÓGICO

1. Sangre humana
2. *Staphylococcus aureus* en caldo nutritivo
3. *Escherichia coli* en caldo nutritivo

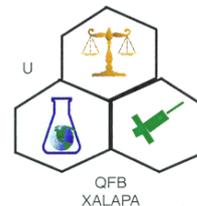
TÉCNICA



1. Obtener 3 ml de sangre heparinizada
2. Agregar a tubos de 10 y 75 o tubo para cultivo: tubo 1: agregar 0.5 ml de sangre + 0.5 ml de cultivo bacteriano; tubo 2 agregar 0.5 ml de sangre más 0.2 ml de cultivo bacteriano; tubo 3: agregar 0.3 ml de sangre más 0.5 ml de cultivo bacteriano, incubar durante 30 minutos a 37° C.
3. Realizar frotis de sangre sin cultivo y frotis de cultivo sin sangre y teñir con colorantes respectivos, observar.
4. Realizar frotis de cada uno de los tubos con sangre y bacteria y teñir con colorante de Wrigh y de Gram. Observar.

CUESTIONARIO:

1. DIBUJE EL PROCESO DE LA FAGOCITOSIS.
2. CUAL ES EL PAPEL DE LOS ANTICUERPOS Y DE LOS FACTORES DEL COMPLEMENTO C3b y C4b en la fagocitosis.
3. DIBUJE QUE OBSERVO EN CADA UNO DE LOS FROTIS REALIZADOS Y REALICE CONCLUSIONES.
4. QUE CELULAS ES UN LISOSOMA Y CUAL ES SU CONTENIDO.
5. QUE MEDIADORES DE LA INFLAMACIÓN SE PRODUCEN EN LA FAGOCITOSIS Y QUIEN LOS PRODUCE?



UNIDAD 5 AGLUTINACION

Laboratorio de Inmunología
Práctica 07
“DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA SÍFILIS
DETERMINACION DE V.D.R.L”
Duración: 01 hr

OBJETIVO

Conocer el método de floculación y su aplicación en el diagnóstico de la Sífilis

INTRODUCCIÓN

La **floculación** es un proceso químico mediante el cual, con la adición de sustancias denominadas floculantes, se aglutinan las sustancias coloidales presentes en el agua, facilitando de esta forma su decantación y posterior filtrado. Es un paso del proceso de potabilización de aguas de origen superficial y del tratamiento de aguas servidas domésticas, industriales y de la minería. Los compuestos que pueden estar presentes en el agua pueden ser: Sólidos en suspensión; Partículas coloidales (menos de 1 micra), gobernadas por el movimiento browniano; y, Sustancias disueltas (menos que varios nanómetros).

PRINCIPIO TEORICO

Se detectan los anticuerpos producidos en respuesta a la infección por *Treponema pallidum*. Los sueros positivos hacen flocular a suspensiones estabilizadas que contienen cardioplipina, lecitina y colesterol, mientras que los sueros negativos no provocan dicha floculación.

MATERIAL Y EQUIPO

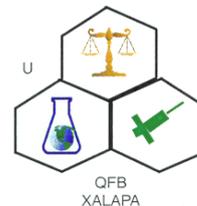
Tubos de ensaye de 12 x 75
Placa horadada
Gradilla
Pipetas Pasteur
Pipetas graduadas de 2 ml.
Microscopio óptico
Rotor mecánico

REACTIVOS.

Equipo o Kit de VDRL
Suero control positivo
Suero control negativo

TOMA DE MUESTRA

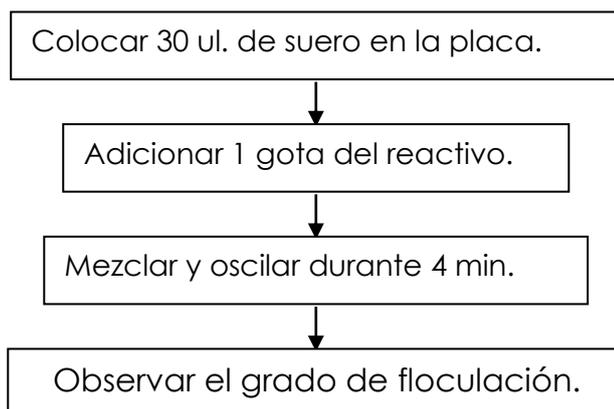
Esta prueba se puede realizar con suero o plasma.



PROCEDIMIENTO

1. Colocar en una placa de vidrio horadada una gota o 0.03 ml del suero o plasma del paciente.
2. Adicionar con el gotero en posición vertical una gota del reactivo al suero o plasma y a los sueros control positivo o control negativo.
3. Mezclar las muestras colocando la placa en la máquina rotatoria a 180 r.p.m. durante 4 min.
4. Con el objetivo seco débil observar el grado de floculación de las mezclas.

DIAGRAMA DE FLUJO



RESULTADO

Positivo = Presencia de agregados, medianos, grandes, o ambos.

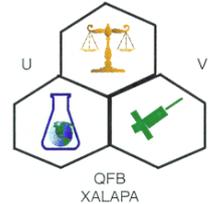
Positivo débil = Presencia de agregados pequeños.

Negativo = Ausencia de agregados.

VALORES DE REFERENCIA

No reactivo

Una prueba serológica negativa puede indicar: el paciente no tiene sífilis, la infección es reciente. Repetir la prueba programándolas para una semana, un mes y tres meses después, para excluir la sífilis en pacientes con síntomas característicos. Las enfermedades que pueden dar falsos positivos son: Paludismo, Lepra, Mononucleosis infecciosa, Lupus eritematoso, Viruela, Catarro común, etc.



Laboratorio de Inmunología
Práctica 08

“REACCIÓN DE AGLUTINACIÓN EN PLACA CON BACTERIAS
(REACCIONES FEBRILES)”

Duración: 01 hr

OBJETIVO:

Conocer el fundamento de la aglutinación en placa en las reacciones febriles, y realizar dichas pruebas con el fin de diagnosticar el agente causal de la enfermedad en el paciente.

INTRODUCCIÓN

La aglutinación en placa, es el producto de la reacción que se lleva a cabo entre el grupo de antígenos serológicos que comprende la sección de las aglutininas febriles tradicionales (*Salmonella*, *Proteus* y *Brucella*), y los anticuerpos presentes en el suero del paciente infectado.

FUNDAMENTACIÓN TEORICA

Las aglutininas febriles *Salmonella*, *Proteus* y *Brucella*, se han utilizado durante décadas para investigar los pacientes con fiebre de origen desconocido. Las infecciones causadas por *Salmonella typhi* son frecuentes, sin embargo, infecciones debidas a otros miembros del grupo de las Salmonelas han aumentado, por ello la selección de los antígenos se ha ampliado para representar a los diferentes bioserotipos encontrados. Los centenares de bioserotipos de *Salmonella* aislados de los humanos se puede dividir en 17 grupos sobre la base de los antígenos O (somáticos), de los cuales, el 95% de los aislamientos de las infecciones humanas pertenecen a uno de los 5 grupos de antígeno O designados A, B, C, D y E, utilizados frecuentemente en las pruebas.

Los antígenos H están presentes en los flagelos de las Salmonelas y desencadena con frecuencia una respuesta del anticuerpo en los pacientes infectados. Los antígenos de la aglutinina H más comunes son:

S. enteritidis paratyphi A

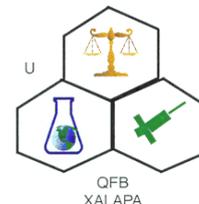
S. enteritidis paratyphi B

S. enteritidis paratyphi C

S. choleraesuis

S. typhi

Las preparaciones de antígeno H consisten en suspensiones muertas por formalina de las especies móviles apropiadas de *Salmonella*. El antígeno O se prepara de manera similar a partir de cultivos de 24 horas, lavando los organismos con alcohol para eliminar la actividad del antígeno H. los antígenos preparados de este modo se utilizan en la prueba macroscópica rápida del portaobjetos y en la técnica de la dilución en tubo macroscópica, utilizando la suspensión mas diluida.



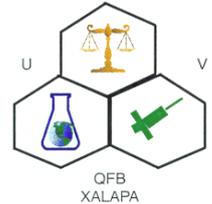
Para el procedimiento en placa se recomiendan diluciones séricas correspondientes a 1:40 y 1:80 como prueba selectiva. Una elevación cuádruple en las muestras apareadas de suero debe considerarse presuntiva de evidencia de infección. Generalmente, los títulos de las aglutininas O se elevan en el 50% de las infecciones por *Salmonella* hacia finales de la primera semana y son significativamente elevadas en el 90% de las personas infectadas entre la tercera y la sexta semana, para después disminuir lentamente hasta niveles bajos o indetectables en 6 a 12 meses. Los títulos de las aglutininas H se elevan más lentamente y pueden permanecer elevadas durante algunos años.

Tabla 1. Nomenclatura del género *Salmonella*

ESPECIE	SUBESPECIE	SEROTIPO	SEROGRUPO
Enterica	Enterica (I)	Paratyphi A	A
		Typhimurium	B
		Paratyphi B	
		Bredeney	
		Choleraesuis	C1
		Montevideo	
		Oranienburg	
	Paratyphi C		
	Newport	C2	
	Typhi	D	
Enteritidis			
Gallinarum			
Pullorum			
Dublin			
Anatum	E		
Butantan			
Give			
	Salamae (II)	Daressalam	
	Arizonae (IIIa)		
	Diarizonae (IIIb)		
	Houtenae (IV)	Houten	
	Indica (VI)	Ferlac	
Bongori	Bongori	Bongor	

Para diagnosticar la brucelosis, se utiliza con frecuencia la serología. El título de las aglutininas séricas se determina con una variedad colonia lisa de *Brucella abortus* inactivada por formalina o con una suspensión fenolada e inactivada por calor. Las 3 especies (*B. abortus*, *B. suis*, *B. melitensis*), tienen en común antígenos de superficie (denominados A y M) y la infección con cualquiera de ellas determina la formación de anticuerpos que reacciona con la preparación de este antígeno. El antígeno se emplea tanto en la prueba macroscópica del portaobjetos como en el procedimiento de dilución en tubo. La prueba del portaobjetos debe utilizarse sólo como una prueba selectiva de suero diluido 1:40 y 1:80. En ocasiones se observa un fenómeno prozona, pero sólo raramente sobrepasa la dilución 1:320.

La inactivación por el calor del suero de los pacientes durante 15 minutos a 56°C reduce la incidencia del fenómeno prozona. Personas con brucelosis curada pueden presentar un aumento transitorio del título de aglutininas asociado con una enfermedad febril, estos títulos pueden elevarse hasta 1:160 en pocos días, para disminuir a continuación a 1:80 en el plazo de 1 semana o 10 días.



El diagnóstico serológico clásico de la enfermedad por *Rickettsias* y ciertas cepas de la especie *Proteus*. Los antígenos de *Proteus* consisten en suspensiones en suero fisiológico de la bacteria muerta por medio de formol y se utilizan lo mismo en la prueba rápida del portaobjeto que en la aglutinación en tubo. La primera se utiliza con frecuencia como procedimiento selectivo, mientras que titulaciones con finalidad diagnóstica se obtienen mediante el procedimiento del tubo. En estas enfermedades, las aglutininas ya pueden aparecer hacia el quinto a sexto día de la enfermedad y generalmente hacia el duodécimo día. Los puntos máximos se alcanzan al inicio de la convalecencia, para disminuir hasta niveles indetectables en el curso de varios meses.

MATERIAL

- Material necesario para la extracción de sangre
- Placa de vidrio para reacciones febriles
- 2 pipetas automáticas de 5 a 100 ul
- 1 pipeta Pasteur con bulbo de hule
- 2 tubos de ensaye de 13 x 100
- 1 pipeta graduada de 1 ml
- Aplicadores de madera

MATERIAL BIOLÓGICO

- Suero sanguíneo

REACTIVOS

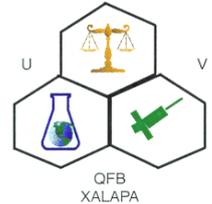
- Antígeno "O" *Salmonella typhi*
- Antígeno "H" *Salmonella typhi*
- Antígeno Paratyphi "A"
- Antígeno Paratyphi "B"
- Antígeno *Brucella abortus*
- Antígeno *Proteus* OX-19
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Solución salina isotónica

EQUIPO

- Centrífuga
- Rotor mecánico
- Microscopio

TÉCNICA

1.- Obtener 4 ml de sangre, colocarlos en un tubo de ensaye limpio y seco y dejar que se



coagule. Centrifugar y separar el suero.

2.- Esperar a que los antígenos estén a temperatura ambiente y agitarlos ligeramente para homogeneizarlos antes de efectuar la prueba. Se recomienda utilizar sueros perfectamente claros y limpios.

3.- Utilizar para la prueba una lámina de vidrio marcada con pequeños cuadros o círculos en serie de cinco anotando previamente el antígeno correspondiente a cada serie.

4.- Usando una pipeta automática mida 80 ul, 40 ul, 20 ul, 10 ul y 5 ul de suero, depositando estos volúmenes en los cuadros de cada serie, procediendo de izquierda a derecha.

5.- Deposite una gota de antígeno (reactivo) a cada una de las cantidades de suero de la serie y mézclelos con un aplicador limpio, comenzando por la última dilución de la derecha y siguiendo con las restantes de la izquierda, de cada serie.

6.- Las mezclas resultantes suero-antígeno van a ser aproximadamente equivalentes en reactividad a diluciones: 1:20, 1:40, 1:80, 1:160 y 1:320.

7.- Agite la placa suavemente, ya sea manual o con un rotor mecánico a más o menos 150 rpm durante 3 minutos.

8.- Las lecturas se deben hacer frente a una buena fuente de luz indirecta observando si existe aglutinación macroscópica. Si en alguna serie con la dilución 1:320 todavía da resultados positivos, se diluye el suero 1:10 con solución salina isotónica y se repite la determinación, correspondiendo las diluciones a 1:400, 1:800, 1:1600 y 1:3200 (empezando con un volumen de 40 ul).

9.- Reportar la máxima dilución que presente aglutinación macroscópica con cada antígeno.

INTERPRETACIÓN

La mayoría de los sueros considerados como normales pueden mostrar títulos de 1:20, 1:40 y ocasionalmente 1:80. La presencia de títulos bajos puede deberse a vacunaciones o a infecciones pasadas o subclínicas.

La mejor indicación de un proceso activo lo marcan 2 titulaciones sucesivas con una diferencia importante entre el primero y el segundo título, lo cual nos indicaría infección activa, aunque también se observa esto en los sueros de convalecientes. Cualquier título mayor de 1:160 debe ser considerado positivo. Es conveniente analizar varias muestras de sangre del enfermo con una diferencia de 5 a 7 días entre una y otra en los casos dudosos.

Ejemplo:

Reacción de Windal:

Salmonella typhi (antígeno O)	-----	Positivo 1:40
Salmonella typhi (antígeno H)	-----	Positivo 1:80
Salmonella paratyphi A	-----	Negativo
Salmonella paratyphi B	-----	Negativo

Reacción de Huddleson:

Brucella abortus	-----	Negativo
------------------	-------	----------

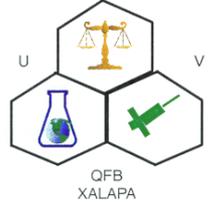
Reacción de Weil-Felix

Proteus OX-19	-----	Positivo 1:20
---------------	-------	---------------

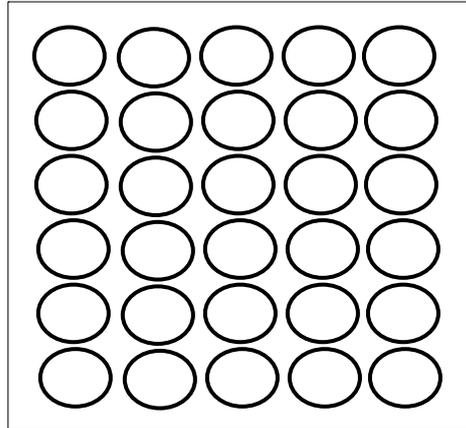


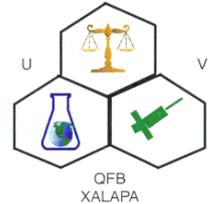
Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



Placa de aglutinación:





Laboratorio de Inmunología
Práctica 09

**“PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN PARA LA
INVESTIGACIÓN DE LA
HORMONA GONADOTROPINA CORIÓNIC HUMANA”**
Duración: 01 hr

OBJETIVO:

Determinar la presencia de gonadotropina coriónica Humana en la orina del paciente, mediante la prueba de inhibición de la hemaglutinación.

INTRODUCCION

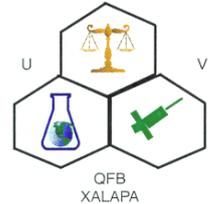
El diagnóstico de embarazo o de alguna alteración con producción de GCH, se determina mezclando la orina del paciente con anticuerpos anti-GCH; se agrega luego a la mezcla eritrocitos de oveja tratados con ácido tánico, formalizados, sensibilizados con GCH. Si la orina contiene GCH neutraliza los anticuerpos anti-GCH, por lo que no ocurre la aglutinación de los eritrocitos.

PRINCIPIO TEORICO

La inhibición de la hemaglutinación (HAI) se basa en la observación de que los eritrocitos no aglutinados a bajas concentraciones sedimentan en tubos de ensayo con un fondo hemisférico formando un anillo claramente delimitado, mientras que los eritrocitos aglutinados forman una película uniforme. La aglutinación progresivamente creciente provoca un incremento gradual del tamaño del anillo y una disminución de su claridad, hasta que desaparecen en una película uniforme.

En el procedimiento d inhibición de la hemaglutinación, se incuban con la orina del paciente suero anti-GCH y eritrocitos recubiertos con GCH. Si existe GCH, ésta neutralizará el antisuero, mientras que, en caso contrario, el antisuero no resulta afectado. El antisuero no afectado tiene capacidad para aglutinar los eritrocitos, de modo que se forma una capa difusa de células. Sin embargo, si el antisuero queda neutralizado, los eritrocitos formarán un anillo. Por definición, los procedimientos de HAI son pruebas en tubo de ensayo. Se necesitan entre 1 y 2 horas para que se produzca la aglutinación y sedimentación.

La prueba de inhibición de la hemaglutinación es una prueba muy sensible y detecta la existencia de GCH. En la orina negativa, los anticuerpos anti-GCH se unen con los eritrocitos sensibilizados produciendo la aglutinación. La detección de GCH en la prueba de inhibición de la hemaglutinación, ocurre a los 40 días de gestación aproximadamente. La prueba debe realizarse evitando el calor, la vibración o la luz solar directa. A temperatura ambiente, la prueba debe leerse dentro de las 2 primeras horas. A 4°C la reacción es más lenta y no puede ser leída antes de 24 horas; sin embargo, la reacción permanece sin cambios durante 18 o 24 horas a esta temperatura.



MATERIAL

- 4 pipetas de 1 ml
- 1 gradilla

MATERIAL BIOLÓGICO

- Orina

REACTIVOS

- Amortiguador HEPES
- Eritrocitos de borrego sensibilizados con GCH y anticuerpos de conejo anti-GCH.

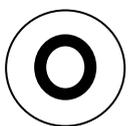
TÉCNICA

- 1.- Quitar el tapón del tubo con eritrocitos.
- 2.- Adicionar 0.1 ml de orina al tubo con eritrocitos, (orina reciente, preferentemente la primera de la mañana).
- 3.- Adicionar 0.2 ml de solución amortiguadora al mismo tubo.
- 4.- Agitar cuidadosamente para obtener una mezcla homogénea.
- 5.- Colocar el tubo en posición vertical en una gradilla o soporte estable y dejarlo en un lugar lejos de la luz solar o de aparatos generadores de calor.
- 6.- Leer exactamente 1 hora después, observar el fondo del tubo sin moverlo.

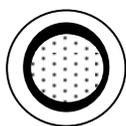
INTERPRETACIÓN

La prueba es positiva cuando los eritrocitos presentes en el tubo de reacción aglutinen, formando un anillo de precipitación, que se observa en el fondo del tubo.

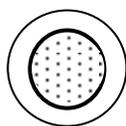
La prueba es negativa cuando la hormona que recubre los eritrocitos contenidos en el tubo reacciona con el suero anti-GCH, formando una malla difusa de color rojizo en el fondo del tubo.



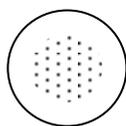
Positivo



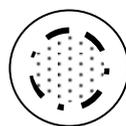
Positivo



Negativo



Negativo

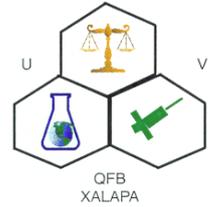


Dudoso



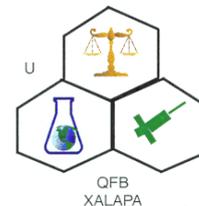
Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



Donde:

a) Suspensión normal de eritrocitos, b) hemólisis, c) hemaglutinación



Unidad 6 Hemólisis
Laboratorio de Inmunología
Práctica 10
“CRIOAGLUTININAS”
Duración: 01 hr

OBJETIVO

Determinar la presencia de autoanticuerpos reactivos en frío.

INTRODUCCIÓN

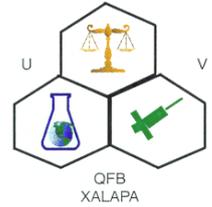
Se realiza en pacientes sugestivos de anemia hemolítica asociada a auto anticuerpos reactivos en frío Responsabilidades. Es responsabilidad de la Dirección del Banco garantizar los recursos indispensables para la realización de éste procedimiento. Es responsabilidad del Jefe de Departamento velar porque se cumpla lo establecido en este procedimiento realizando los controles necesarios, así como el desempeño del jefe técnico en ese sentido. Es responsabilidad del técnico el cumplimiento de lo establecido en el presente documento.

MATERIAL

- Centrífuga de mesa para tubos
- Neveras de conservación de sangre 4-6°C
- Baño de María 37°C con agua destilada • Aglutinoscopio.
- Tubos de ensayo de 13x100
- Gradillas para tubos de ensayo Manual de Prácticas Médicas
- Jeringuillas de 10 o 20 mL
- Agujas 20 o 21
- Pipetas automáticas Eppendorf de 100 y 200 uL
- Puntas amarillas y azules para las pipetas
- Torundas
- Ligaduras
- Aplicadores de madera.
- Anticoagulante EDTA o heparina
- Alcohol 70 % o hibitane alcohólico
- Solución salina 0,9 % Operaciones preliminares

TECNICA

1. Prepare el área de trabajo con material y reactivos que van a ser utilizados.
2. Coloque en una estufa a 37°C la jeringuilla y dos tubos, uno seco y otro con anticoagulante.
3. Rotule los tubos de ensayo hasta el número once.
4. Tome muestra de sangre.
5. Procedimiento: Coloque las muestras en Baño de María a 37°C por media hora.



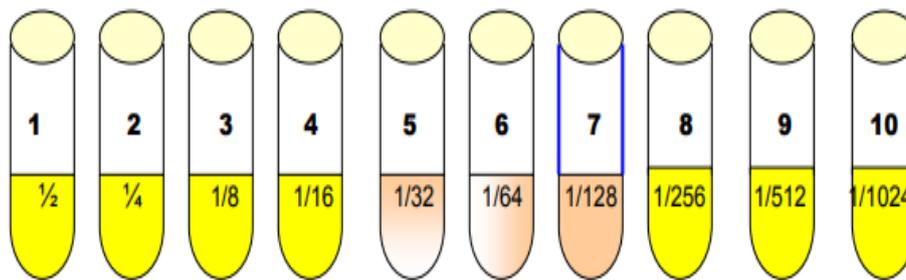
Centrifugue la muestra sin anticoagulante 10 min a 3 000 rpm para obtener el suero. Prepare una suspensión 2-5 % de los hematíes del paciente. En cada tubo rotulado agregue 100uL de solución salina 0.9 % y una gota de la suspensión de hematíes del paciente hasta el tubo # 10 Al primer tubo añada 100 uL de suero del paciente y mézclelo bien con la pipeta y de éste tome 100 uL y añádalo al tubo #2 repita esta operación hasta el tubo #10 Mantenga los tubos dos horas a 4°C Centrifugue 1 min a 1 000 rpm y lea sobre la lámpara, desprendiendo suavemente el botón.

6. Puede mantener la muestra a 4°C durante 24 horas y luego centrifugar 1 min 1 000 rpm y leer.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Informe el resultado del último tubo donde aparezca una aglutinación visible; por ejemplo 1/128. Considere negativo el resultado si es menor que 1/32.

Ejemplo:

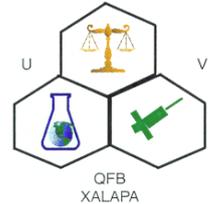


Ejemplo:

Número de tubo: 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

Dilución: $\frac{1}{2}$ $\frac{1}{4}$ $\frac{1}{8}$ $\frac{1}{16}$ $\frac{1}{32}$ $\frac{1}{64}$ $\frac{1}{128}$ $\frac{1}{256}$ $\frac{1}{512}$ $\frac{1}{1024}$

Controles: si es necesario utilizar en cada serie controles negativos y positivos.



UNIDAD 7: PERFILES
Laboratorio de Inmunología
Práctica 11

**“PERFIL REUMÁTICO: PROTEÍNA C REACTIVA,
FACTOR REUMATOIDE Y ANTIESTREPTOLISINAS”**

Duración: 06 hr

DETERMINACION DE PROTEINA C REACTIVA.

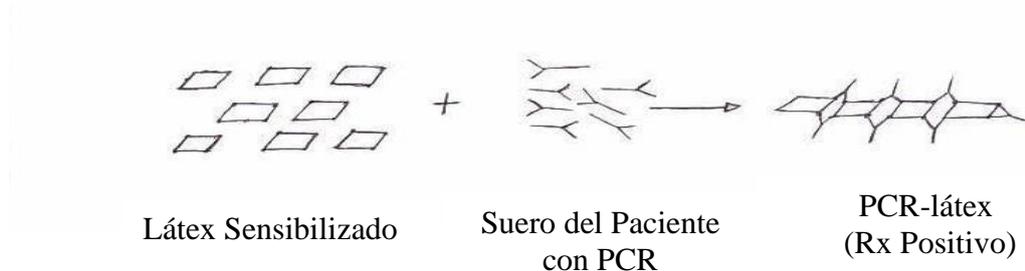
OBJETIVO

Que el estudiante conozca el principio de aglutinación directa y lo aplique a una reacción inflamatoria aguda como lo es la determinación de la proteína C reactiva.

INTRODUCCIÓN

La proteína C reactiva presente en el suero del paciente sirve como antígeno y cuando el suero conteniendo PCR se mezcla con el látex sensibilizado se produce una aglutinación detectable macroscópicamente.

FUNDAMENTO TEORICO

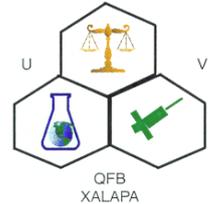


MATERIAL Y EQUIPO

Placa de aglutinación fondo negro
Tubos de 12 x 75
Pipetas Pasteur
Pipetas graduadas de 2 ml.
Gradilla

REACTIVOS

Látex sensibilizado
Suero control positivo
Suero control negativo
Solución salina
Amortiguador salino de glicina concentrado. Antes de usarse debe ser diluido en porción 1 parte por cada 19 partes de agua destilada. Con 10 ml de concentrado se preparan 200 ml de solución de trabajo.



TOMA DE MUESTRA

El operador le explicará al paciente que le extraerá una muestra de sangre venosa para poderle realizar su estudio. La muestra se obtendrá en un tubo de tapón rojo para obtener suero.

PROCEDIMIENTO

1. Hacer la dilución 1:20 del suero problema diluyendo 0.1 ml de suero con 1.9 ml de la solución de trabajo.
2. La placa tiene tres espacios uno para el control positivo, otro para el control negativo y otro de problema; poner una gota de la dilución en el espacio para el problema.
3. En el espacio positivo colocar una gota del suero control positivo.
4. En el espacio negativo colocar una gota del suero control negativo.
5. Agregar una gota de látex a cada espacio y mezclar con un aplicador diferente para cada área. Mover en ángulo de 45° la laminilla por 2 minutos.
6. Observar si hay o no aglutinación.

PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO.

1. Preparar una serie de diluciones usando como factor 2 tomando en cuenta que se debe partir del suero diluido 1:20. Si la última dilución del suero continuara mostrando aglutinación, se sugiere utilizar un factor más alto, por ej. Comenzando por 1:20 hasta 1:640 y si esta última dilución persistiera la positividad se debe realizar diluciones mayores.
2. Colocar 1 gota de cada dilución del suero en las áreas marcadas en la laminilla.
3. Colocar una gota del diluyente del suero como control de este último.
4. Mezclar el frasco que contiene el reactivo de látex PCR y añadir 1 gota del reactivo a cada una de las áreas de la laminilla.
5. Proceder como en el paso 6 y 7 del procedimiento cualitativo.

RESULTADOS

Aglutinación = Positivo.

No aglutinación = no reactivo

VALORES DE REFERENCIA

No reactivo

La prueba positiva suele observarse en infecciones bacteriológicas como tuberculosis y neumocócicas y en otros trastornos inflamatorios no infecciosos como fiebre reumática aguda, artritis reumatoide aguda y lupus eritematoso sistémico, cánceres e infarto del miocardio.



DETERMINACIÓN DEL FACTOR REUMATOIDE.

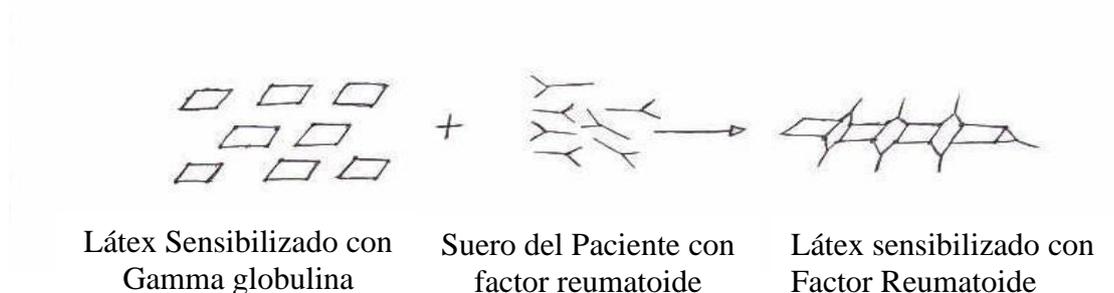
OBJETIVO

Que el estudiante conozca los principios de la aglutinación indirecta y su aplicación en la determinación de una molécula de tipo autoinmune como lo es el factor reumatoide.

INTRODUCCIÓN

Es una reacción inmunológica entre el látex sensibilizado con gamma globulina humana y el factor reumatoide presente en el suero del paciente.

PRINCIPIO TEORICO



MATERIAL Y EQUIPO

Una placa de fondo oscuro
Tubos de 12 x 75
Pipetas Pasteur
Pipetas graduadas de 2 ml.
Palillos de madera.

REACTIVOS

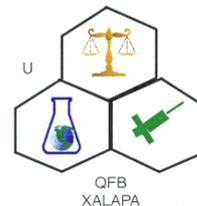
Látex (Partículas de poliestireno sensibilizadas con gamma globulina humana).
Suero control positivo
Suero control negativo
Solución amortiguadora

TOMA DE MUESTRA

El encargado de tomar la muestra explicara al paciente que debe estar en ayunas y que se requiere extraer una muestra de sangre venosa. La muestra se obtendrá en un tubo de 7 ml de tapón rojo para obtener suero.

PROCEDIMIENTO CUALITATIVO

1. Permitir que los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente.
2. Preparar una dilución 1:20 del suero problema, diluyendo 0.1 ml de suero con 1.9 ml de solución amortiguadora.



3. Poner 1 gota de suero diluido en las áreas marcadas en la laminilla. Colocar una gota de suero control negativo y control positivo en las áreas marcadas en la laminilla.
4. Mezclar el reactivo de látex reumaclin hasta tener una suspensión homogénea y añadir 1 gota de reactivo de látex a cada uno de los sueros y controles.
5. Mezclar con un aplicador diferente por cada área.
6. Mover en un ángulo de 45^a la laminilla por 2 minutos.
7. Observar inmediatamente la aglutinación utilizando una fuente de luz directa. Comparar las reacciones del suero y de los controles.

RESULTADOS

Presencia de aglutinación = Positivo

Ausencia de aglutinación = no reactivo

VALORES DE REFERENCIA

No reactivo

PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO

1. Preparar una serie de diluciones usando como factor 2. Si la última dilución del suero continuara mostrando aglutinación se sugiere utilizar un factor más alto comenzando por 1:20 hasta 1:640.
2. Colocar 1 gota de cada dilución del suero en las áreas marcadas en la laminilla.
3. Colocar una gota del diluyente del suero como control de este último.
4. Mezclar el frasco que contiene el reactivo de látex Reumaclin hasta obtener una suspensión homogénea y añadir 1 gota del reactivo a cada una de las áreas de la laminilla.
5. Comenzando con el control del diluyente y con la dilución más alta hasta la más baja, utilice un aplicador y extender los reactantes sobre el área marcada en la laminilla.
6. Proceder como en el paso 6 y 7.

RESULTADOS

Observar hasta cual de las diluciones presenta aglutinación y anotar el título correspondiente.

VALORES DE REFERENCIA

La medición del factor reumatoide es el estudio inmunológico más útil para investigar la presencia de artritis reumatoide. Aunque por largo tiempo los mecanismos inmunológicos se han considerado implicados en la artritis reumatoide (AR) y lupus eritematoso (LED), a pesar de ello, la etiología y la patogenia de estas dos enfermedades no se comprende del todo.



TITULACIÓN DE ANTIESTREPTOLISINAS

OBJETIVO:

Determinar el título de antiestreptolisinas, para control o diagnóstico de diversas enfermedades infecciosas.

INTRODUCCIÓN

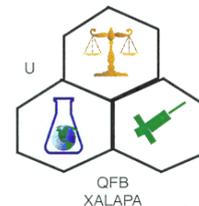
Cuando la estreptolisina O en su forma reducida se agrega a glóbulos rojos provoca hemólisis. Si el suero de un paciente que contiene antiestreptolisina O se añade a la estreptolisina se produce una reacción antígeno-anticuerpo y el anticuerpo neutraliza la estreptolisina O parcial o totalmente según el nivel de anticuerpo presente. Una cantidad constante de estreptolisina (antígeno) se agrega a cantidades cada vez menores de suero, y si el anticuerpo presente es suficiente para neutralizar el antígeno no hay hemólisis cuando se agrega glóbulos rojos. Cuando el antígeno excede el anticuerpo, el exceso de estreptolisina cause hemólisis. El título de anticuerpo de antiestreptolisina O, es la reciproca de la mayor dilución de suero que impide la hemólisis de los glóbulos. El título de antiestreptolisina O se mide en unidades Todd (originalmente definidas como la cantidad de suero que apenas neutraliza 2.5 dosis hemolíticas mínima de una estreptolisina estandarizada).

PRINCIPIO TEORICO

Casi todas las cepas de estreptococos grupo serológico A producen 2 factores hemolíticos, estreptolisina O y S. ambas son capaces de hemolizar glóbulos rojos. Cuando un individuo tiene una infección estreptocócica grupo A, la estreptolisina O estimula el desarrollo de anticuerpo específico, antiestreptolisina O y la estreptolisina S no estimula la formación de anticuerpo.

El anticuerpo antiestreptolisina O está presente en casi todas las personas en título bajo, porque las infecciones estreptocócicas son comunes. Cuando un paciente tiene signos que sugieren fiebre reumática, es importante determinar si ha tenido o no una infección reciente. Títulos elevados en aumento, con un nivel máximo de 4 a 6 semanas después de la infección, indican infección estreptocócica reciente. La prueba se considera un auxiliar útil en el diagnóstico diferencial de fiebre reumática temprana y artritis reumatoidea (en el cual no se eleva y generalmente no hay aumento), cuando el cuadro clínico no es decisivo. Las determinaciones seriadas a intervalos bisemanales dan más información valiosa que una sola determinación. La prueba puede usarse en el diagnóstico diferencial de glomerulonefritis aguda y asma infecciosa, pues ambas muestran títulos elevados y otras enfermedades que presentan cuadros clínicos semejantes, sin títulos elevados.

La importancia de esta técnica radica en que los títulos séricos de antiestreptolisina O pueden tener valor diagnóstico en pacientes que tienen o han tenido recientemente una infección estreptocócica grupo A, ya que las secuelas de estas infecciones incluyen fiebre reumática, glomerulonefritis y eritema nudoso.



MATERIAL

- 3 tubos de ensaye de 13 x 100
- 15 tubos de hemólisis de 12 x 75
- 2 pipetas graduadas de 2 ml
- 2 pipetas graduadas de 1 ml
- 1 pipeta graduada de 5 ml
- 2 pipetas graduadas de 10 ml
- 1 gradilla metálica
- Material necesario para la extracción de sangre

MATERIAL BIOLÓGICO

- Suero del paciente
- Suspensión de glóbulos rojos del grupo O Rh (+) o del mismo grupo del paciente

REACTIVOS

- Estreptolisina O
- Solución amortiguadora pH 6.5 - 6.7
- Solución salina al 0.85%
- Hidrosulfito de sodio

EQUIPO

- Centrífuga
- Baño María

TÉCNICA

La estreptolisina O ha sido preparada y estandarizada para la determinación del título de antiestreptolisina en el suero de personas con infecciones por estreptococos del grupo A. Esta estreptolisina se presenta en forma oxidada que es estable pero no es activa.

Modo de activarla:

- a) Se reconstituye con agua destilada con el volumen indicado en la etiqueta del frasco.
- b) Para 5 ml de estreptolisina reconstituida se adiciona el hidrosulfito de sodio contenido en uno de los tubos capilares que se adjunta.

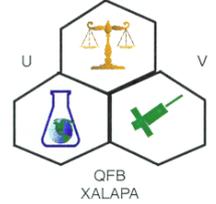
INTERPRETACIÓN

El título de antiestreptolisina O se expresa en unidades Todd. Estas unidades son la recíproca de la dilución más alta del suero que neutraliza completamente la estreptolisina O. Así, un suero que no presenta hemólisis en los tubos 1 a 4, huellas de hemólisis en el tubo 5 y hemólisis completa en todos los demás, es reportado como 125 unidades Todd. El dar valores humanos normales de antiestreptolisina O es difícil o imposible; el nivel de los individuos sanos se considera generalmente de 0 a 125 unidades Todd (UT), pero se han encontrado títulos mayores en individuos sin fiebre reumática ni otra enfermedad. Un título de 400 UT o más, se considera definitivamente elevado. Las determinaciones individuales tienen poco o



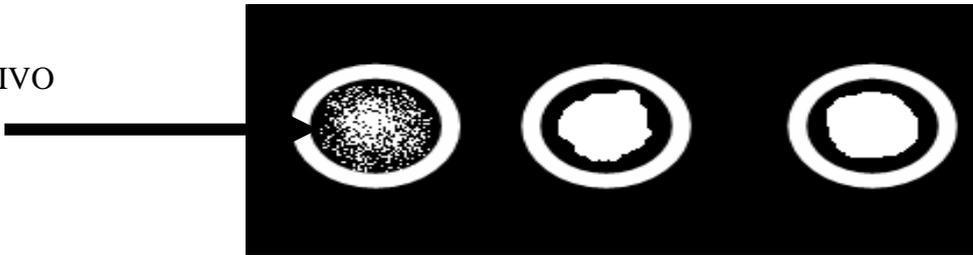
Universidad Veracruzana

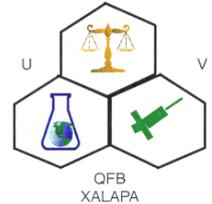
UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



ningún valor. Si un individuo muestra un aumento de 50 a 250 UT en relativamente poco tiempo, ello tiene significación diagnóstica. Un número bajo persistente de unidades Todd, 50 o menos, es útil para excluir fiebre reumática.

POSITIVO





UNIDAD 8. INMUNOENSAYOS

GENERALIDADES

El ELISA 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 sobre un soporte (inmuno-adsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente 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 un colorímetro.

Los diferentes tipos de ELISA son los que se enumeran a continuación:

Anticuerpos marcados:

ELISA Directo

ELISA Indirecto

ELISA sándwich: Doble (DAS) y Heterólogo (HADAS)

Antígeno marcado

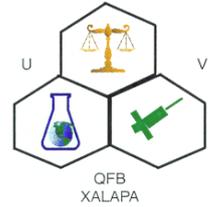
ELISA competitivo



ELISA Directo.

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble (“tapizado”) de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de anticuerpos marcados (“conjugados”) con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

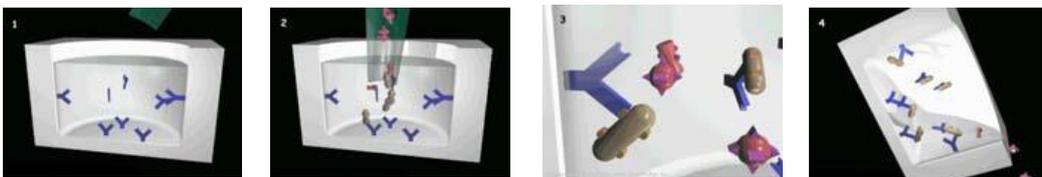


- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

ELISA Indirecto.

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un sustrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

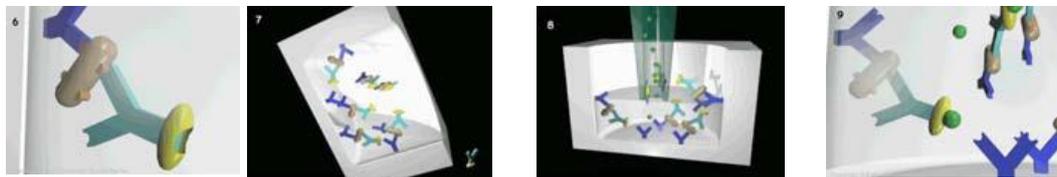


1

2

3

4



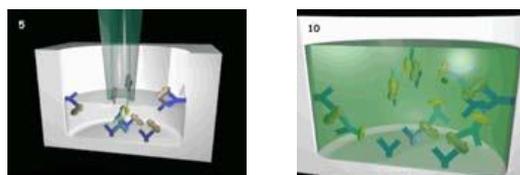
5

6

7

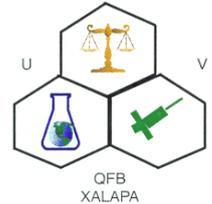
8

Pasos de un ELISA (1-10)



9

10



ELISA Sándwich “DAS” (Double Antibody Sandwich).

Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

ELISA Sándwich “HADAS”.

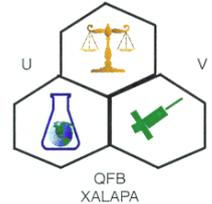
Consta de las siguientes etapas:

- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición de la muestra problema (extracto vegetal, sangre, suero, plasma, etc.), de tal forma que si está presente el agente patógeno de diagnóstico (antígeno), reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.
- Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte), los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos. Lavado para eliminar los anticuerpos que no hayan reaccionado.
- Adición de anticuerpos conjugados con una enzima anti-anticuerpos empleados en el paso anterior. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado.

ELISA Competitivo.

Consta de las siguientes etapas:

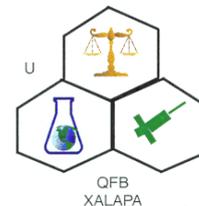
- Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.
- Adición en concentración conocida de una mezcla de antígenos del anticuerpo utilizado en el paso anterior, marcados con una enzima y antígenos desconocidos objeto de estudio. Paralelamente, añadir únicamente antígenos del anticuerpo usado en el paso anterior, marcados con una enzima. Lavar para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado.
- Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcadora. Se puede parar la reacción si se desea.
- Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Si las lecturas de ambas pruebas son análogas, el antígeno a estudio no tiene nada que ver con los anticuerpos empleados para tapizar el soporte. Si hay diferencia en las lecturas de ambos pocillos, el antígeno objeto de estudio, está relacionado serológicamente con el anticuerpo empleado para tapizar el soporte y la diferencia de densidad óptica, es proporcional a la concentración del antígeno problema en la muestra.

Todos los tipos de ELISAs descritos se pueden resumir en dos grandes grupos:

- ELISAs para detectar antígenos: ELISAs sándwich.
- ELISAs para detectar anticuerpos: ELISAs indirectos.

La fase sólida debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y la reproducibilidad de la unión de antígenos o anticuerpos sobre su superficie. Las microplacas de 96 pocillos y un volumen de 350 μ L son especialmente ventajosas para procesar un elevado número de muestras y una vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo siempre que se mantenga seco y a baja temperatura. Normalmente se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles y con o sin tapa.





Microplacas de poliestireno de 96 pocillos

Las técnicas de ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento para la automatización de todas y cada una de las etapas. Esta completa automatización se justifica por la necesidad de procesar y analizar un gran número de muestras y necesitar una elevada repetibilidad de resultados.



Lavador de placas de 96 pocillos



Lector de placas de 96 pocillos

DESCRIPCION

Adsorción de antígenos y anticuerpos (“tapizado”).

Los métodos empleados son dos fundamentalmente:

- Dilución del antígeno o anticuerpo en tampón carbonato (pH 9,6) e incubación posterior durante 3h a 37°C o 16h a 4°C.
- Tratamiento a 40-50°C en tampón fosfato (PBS) o en agua fisiológica tamponada pH 7,2-7,4 hasta desecación.

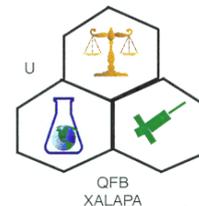
Solución de lavado.

Solución salina con Tween 20 como agente tensioactivo:

ClNa..... 8,5gr
Tween 20..... 0,5mL
Agua destilada..... 1000mL

Conjugados.

La enzima escogida como marcador debe unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, encontrarse en estado puro a un precio razonable y tener un substrato cromogénico o fluorogénico conveniente y de fácil preparación. Las enzimas más utilizadas son fosfatas



alcalina, peroxidasa de rábano y β -galactosidasa; a continuación, se muestra una tabla con las ventajas y desventajas de cada una, así como los substratos que se emplean con cada una de ellas.

Las operaciones de marcado o conjugación llevan implícitas dos etapas:

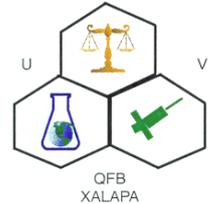
- Purificación de los anticuerpos a partir de un antisuero bruto mediante una precipitación generalmente salina de las proteínas del antisuero, seguida de una diálisis y purificación de la fracción de anticuerpos mediante filtración molecular, cromatografía o separación en gradiente de densidad mediante ultracentrifugación. Finalmente, se suele concentrar los anticuerpos purificados y ajustarlos a una dosis de 1mg/mL.
- Marcado de los anticuerpos con la enzima mediante el uso de un agente puente que normalmente suele ser el glutaraldehído o el del m-periodato sódico (apenas existen diferencias entre ellos en cuanto a los resultados finales).

Actualmente existe otra posibilidad para sustituir el conjugado anti-especie para la detección de IgGs y es la utilización de proteína A o G marcadas con peroxidasa. Una vez se disponga del conjugado debe ser conservado hasta el momento de su utilización; esta conservación se suele realizar mediante liofilización, congelación a -70°C o filtrado estéril y conservación a -20°C mezclado con igual volumen de glicerol bidestilado estéril. La búsqueda de la concentración óptima de uso depende ligeramente del tipo de ELISA empleado; para cualquier ELISA que utilice anti-anticuerpos conjugados, se suele probar diferentes diluciones del conjugado (desde 1:100 hasta 1:2000) frente a sucesivas diluciones de antisuero en placas tapizadas con antígeno a concentración idónea. Aquella dilución del conjugado que produzca menor reacción inespecífica (menor color de fondo o “background”) con muestras negativas e implique una clara distinción de las muestras positivas, será la óptima. La elección de una concentración de conjugado óptima va completamente ligada a planteamientos económicos en los que se ha de procurar el mayor ahorro del conjugado aun a costa de aumantar el tapizado.

La elección del sustrato es de gran importancia para la estandarización del método ELISA y hay que tener varios factores en cuenta, como son sensibilidad, especificidad, repetibilidad, facilidad de lectura y complejidad de preparación, así como estabilidad después de la parada de la reacción.

Aplicaciones del ELISA.

- ❖ Enfermedades producidas por parásitos
- ❖ Babesias y tripanosomas
- ❖ Toxocara canis
- ❖ Toxoplasmosis
- ❖ Triquinosis
- ❖ Enfermedades producidas por Micoplasmas
- ❖ Enfermedades producidas por bacterias



- ❖ Mycobacterium tuberculosis
- ❖ Brucelas
- ❖ Enterotoxinas Vibrio cholerae
 - ❖ Estreptococos
 - ❖ Salmonelas
- ❖ Enfermedades producidas por virus
- ❖ Enfermedad de Aujeszky
- ❖ Enfermedad de Newcastle
- ❖ Fiebre aftosa
- ❖ Leucemia felina
- ❖ Peste porcina africana
- ❖ Peste porcina clásica
- ❖ Rinotraqueitis infecciosa
- ❖ Rotavirus
- ❖ Artritis vírica
- ❖ VIH

Otras aplicaciones

- ❖ Hormonas
- ❖ Gonadotropina coriónica
- ❖ Progesterona
- ❖ Testosterona
- ❖ Hormonas tiroideas
- ❖ Cuantificación de inmunoglobulinas
- ❖ IgG
- ❖ IgE
- ❖ IgA
- ❖ Inmunopatología
- ❖ Anticuerpos anti-DNA
- ❖ Factor reumatoide
- ❖ Inmunocomplejos circulantes
- ❖ Hepatitis A B C

Pasos generales de un ELISA (ver figura pasos de un ELISA (1-10))

Tapizado del pocillo con el antígeno o anticuerpo.

Adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo.

Lavado del pocillo para eliminar el exceso de antígeno o anticuerpo no unido

Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima

Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo

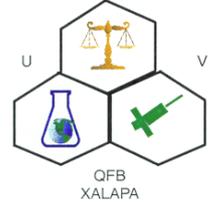
Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida

Adición del sustrato



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora

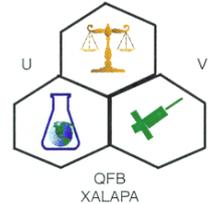


Unión del sustrato a la enzima
Desarrollo De color

Realizar Las determinaciones de los diferentes kits disponibles en el laboratorio.

Laboratorio de Inmunología
Práctica 12
“DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI VIH”
Duración: 02 hr
SEGUIR LA TECNICA DEL INSERTO PROPORCIONADO EN EL AULA

Laboratorio de Inmunología
Práctica 13
“DETERMINACIÓN DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DE
LA HEPATITIS B (HbsAg)
Duración: 02 hr
SEGUIR LA TECNICA DEL INSERTO PROPORCIONADO EN EL AULA



UNIDAD 9. INMUNOHEMATOLOGIA

Laboratorio de Inmunología

Práctica 14

“DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUÍNEOS DEL SISTEMA ABO”

Duración: 02 hr

OBJETIVO:

Realizar la determinación de los grupos sanguíneos del sistema ABO.

INTRODUCCIÓN

Los grupos sanguíneos se caracterizan por la presencia sobre los eritrocitos de antígenos conocidos como aloantígenos (antígenos encontrados en ciertos individuos de una especie pero no en otros); cuando estos antígenos encuentran anticuerpos homólogos, ya sea *in vivo* o *in vitro*, las células de las cuales forman parte pueden ser aglutinadas.

FUNDAMENTO TEORICO

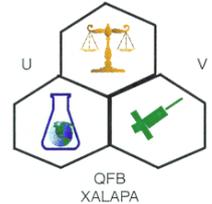
Los anticuerpos del sistema ABO son inmunoglobulinas IgM y a temperatura ambiente o superior, aglutinan los hematíes suspendidos en solución salina. La elevación de la temperatura a 37°C, debilita o elimina la reacción. Como los anticuerpos aparecen de forma natural en el suero de las personas que carecen del antígeno correspondiente, el fenotipo de los hematíes determina y confirma clasificando las células y sueros por grupos.

Los grupos sanguíneos ABO están determinados por los genes alélicos A, B y O. Estos genes producen las enzimas transferasas que conjugan los azúcares al carbohidrato precursor. Estas transferasas son específicas para sustratos: la transferasa A para la N-acetilgalactosamina y la transferasa B para galactosa. El gen O no produce transferasa que pudiera modificar la sustancia precursora, es decir, el antígeno H. En ausencia de determinaciones directas de transferasa y de estudios familiares, no es posible determinar si una persona que pertenece al grupo A es homocigota con 2 genes A o heterocigota con un gen A y un gen O.

Dependiendo de los sueros que reaccionan, podemos saber a que grupo sanguíneo pertenece el paciente. Además de los anticuerpos normales, pueden encontrarse isoanticuerpos inmunitarios en el suero de individuos que han recibido previamente transfusiones o de algunas mujeres que han dado a luz hijos con características sanguíneas distintas a las propias, como resultado de los factores heredados del padre.

El sistema ABO posee dos rasgos característicos únicos que no se encuentran en ningún otro sistema de grupos sanguíneos:

- La presencia usual de aglutininas fuertemente reactivas en el suero de los que carecen de los antígenos correspondientes, y
- La presencia regular de antígenos ABH en muchas células hícticas y de sustancia



ABH en las secreciones de los llamados secretores.

Estas dos características únicas, hacen del sistema ABO, el más importante de los grupos sanguíneos en la transfusión sanguínea y los trasplantes de órganos. La presencia regular de potentes anticuerpos anti-A o anti-B, o ambos, en el suero, convierte la tarea de demostrar los antígenos A y B en los eritrocitos en una labor fácil. Esta puede ser la razón por la que el sistema de los grupos sanguíneos ABO fue el primero en ser descubierto.

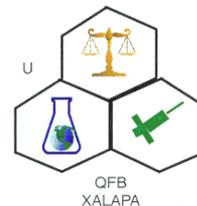
Los grupos sanguíneos se heredan según las leyes genéticas de Mendel. El mecanismo estriba en los 46 cromosomas de la célula, dispuestos en 23 pares. Existe un foco para cada característica de cada progenitor, estos códigos o genes característicos se llaman alelos. Si los alelos (o alelo morfos) son idénticos, el nuevo individuo se dice que es homocigoto; si son diferentes, entonces es heterocigoto. Cuando un gen es dominante, se impone al gen recesivo en el heterocigoto, y solo se manifiesta la característica propia del gen dominante, por ejemplo, si posee la característica A, que es dominante respecto a la O, el sujeto reacciona como A (y no como AO). Un gen recesivo a veces no llega a expresarse, salvo en un sujeto homocigoto para este gen, por ejemplo, el individuo hereda dos veces el carácter O y reacciona como O.

La determinación de grupo ABO se efectúa mediante dos pruebas complementarias, con eritrocitos y en suero. La prueba con eritrocitos, consiste en poner en contacto sueros de prueba conocida anti-A, anti-B, anti-AB con los eritrocitos que se quieren analizar. El antígeno o los antígenos del eritrocito definen el grupo sanguíneo A, B, AB u O. La prueba en suero consiste en poner el suero que se quiere analizar en contacto con eritrocitos de prueba conocidos A¹, A² y B. Cada individuo tiene en su suero el anticuerpo o los anticuerpos correspondientes al antígeno o antígenos faltantes en sus eritrocitos.

Como los antisueros comerciales son altamente potentes, el grupo celular puede realizarse tanto en placa como en tubo; como los anticuerpos de aparición natural en el suero desconocido son débiles y de título bajo, dicho grupo sérico debe realizarse solo en tubos de ensayo donde la centrifugación intensificara la reacción. La aglutinación en portaobjetos se considera menos delicada que los métodos en tubo de ensayo, y con mayor probabilidad de formar rollos, pero suele utilizarse por ser más fácil y conveniente y necesitar menos material.

MATERIAL

- Material necesario para la extracción de sangre
- 10 tubos de ensayo de 10 x 75
- 2 tubos de ensayo de 13 x 75
- Portaobjetos o placa de vidrio
- Aplicadores de madera
- 1 pipeta de 5 ml
- 1 pipeta automática de 100 ul



MATERIAL BIOLÓGICO

- Sangre total o suspensión de glóbulos rojos al 10% en solución salina.
- Suero sanguíneo

REACTIVOS

- Suero hemoagrupador anti-A
- Suero hemoagrupador anti-B
- Suero hemoagrupador anti-AB
- Suspensión de células A¹
- Suspensión de células A²
- Suspensión de células B
- Suspensión de células O
- Solución salina fisiológica

EQUIPO

- Centrífuga

TÉCNICA PRUEBA DIRECTA

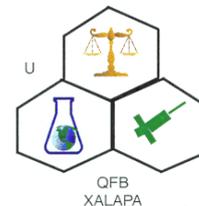
MÉTODO EN PORTAOBJETOS

- 1.- Preparar una suspensión al 10% de glóbulos rojos en solución salina fisiológica en su propio plasma o en su propio suero (también puede utilizarse sangre total).
- 2.- En un extremo del portaobjetos o en un círculo de la placa de vidrio colocar una gota de antisuero anti-A.
- 3.- En el otro extremo del portaobjetos o en otro círculo de la placa de vidrio colocar una gota de suero anti-B.
- 4.- A cada gota de los antisueros agregar una gota de la suspensión de los glóbulos rojos o una gota de sangre total.
- 5.- Mezclar bien. Bascular el portaobjetos.
- 6.- Las pruebas que no muestran aglutinación deberán ser observadas durante no más de dos minutos. No interprete como aglutinación el secamiento de la periferia.

NOTA: La sangre obtenida por punción digital puede ser utilizada directamente en el portaobjetos; la sangre sin anticoagulante debe mezclarse rápidamente con el suero de prueba para evitar coagulación. No interprete los hilos de fibrina como aglutinación.

MÉTODO EN TUBO

- 1.- Preparar una suspensión al 5% de glóbulos rojos en solución salina fisiológica, en su propio plasma o suero.



- 2.- A un tubo de ensaye pequeño (10 x 75) agregar una gota de suero anti-A.
- 3.- A un segundo tubo de ensaye, agregar una gota de suero anti-B.
- 4.- A cada tubo agregar una gota de la suspensión de glóbulos rojos al 5% o con uno o dos aplicadores transferir una cantidad equivalente de glóbulos rojos de la muestra de sangre total.
- 5.- Mezclar bien y centrifugar ambos tubos, o dejar reposar a temperatura ambiente 15 a 60 minutos. La centrifugación sugerida es de aproximadamente 15 segundos a 3,400 rpm o un minuto a 1,000 rpm.
- 6.- Para facilitar la lectura después de la centrifugación, se puede agregar una gota de solución salina fisiológica a cada tubo.
- 7.- Resuspender los eritrocitos mediante ligera agitación y examinar para ver si hay aglutinación.

INTERPRETACIÓN:

Las reacciones posibles con los sueros anti-A y anti-B se muestran en la siguiente tabla:

Aglutinación con:		
Anti-A	Anti-B	Grupo sanguíneo
+	-	A
-	+	B
-	-	O
+	+	AB

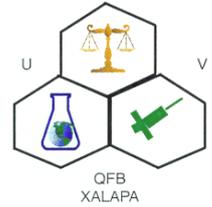
Se recomienda que la sangre que reacciona como grupo O con los sueros anti-A y anti-B sean probadas nuevamente.

TÉCNICA PRUEBA INVERSA

Preparación de las suspensiones de células.- Se toman varios tubos de sangre A¹ libre de fibrina y suero, y se coloca en un tubo rotulado A¹ aproximadamente 1 ml de la mezcla de dicho paquete globular. Se le agrega solución salina fisiológica (10 volúmenes se solución por volumen de células) y se mezcla por inversión varias veces hasta lograr una suspensión homogénea. Se centrifuga 2 minutos a 5,000 rpm. Se retira el sobrenadante por decantación rápida sin perder glóbulos, y se vuelve a agregar solución salina para hacer el segundo lavado. El paquete globular se lava tres veces en total, después de los cuales con una pipeta Pasteur, se descarta todo el sobrenadante para dejar el paquete globular concentrado. Se mide 0.1 ml de este paquete lavado y se pasa a un tubo rotulado A¹ (2%). Se le agregan 4.9 ml de solución salina fisiológica.

Se procede de igual forma con las células A², B y O positivas y O negativas.

- 1.- Rotular 4 tubos de la siguiente manera: A¹, A², B y O.
- 2.- Colocar en cada tubo, 2 gotas del suero problema y una gota de la suspensión de células correspondiente, como se indica a continuación:



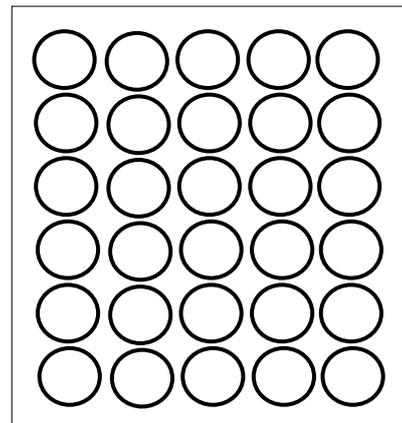
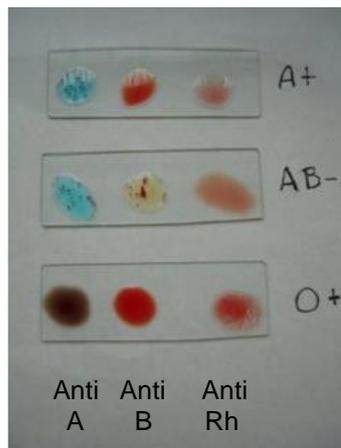
Tubo	Suero problema	Células al 2%
1	2 gotas	1 gota de A ¹
2	2 gotas	1 gota de A ²
3	2 gotas	1 gota de B
4	2 gotas	1 gota de O

- 3.- Los tubos se agitan suavemente y se centrifugan a 3,400 rpm durante 30 segundos.
- 4.- Los tubos se leen uno a uno, anotando inmediatamente los resultados para evitar errores.

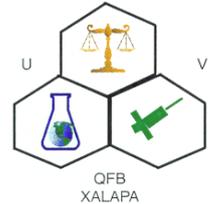
INTERPRETACIÓN:

El suero que reacciona con determinada suspensión de células corresponde al grupo inverso del que aglutina, ya que no puede tener anticuerpos contra sus propios antígenos. Las reacciones posibles se muestran en la siguiente tabla:

Aglutinación con:					Grupo sanguíneo
Células	A ¹	A ²	B	O	
+	-	-	-	-	B
-	+	-	-	-	B
-	-	+	-	-	A
-	-	-	-	-	AB
+	-	+	+	-	O
-	+	+	+	-	O



Placa de aglutinación



Laboratorio de Inmunología
Práctica 15
“DETERMINACIÓN DEL FACTOR Rh“
Duración: 02 hr

OBJETIVO:

Realizar la determinación del factor Rh y conocer su transmisión genética.

INTRODUCCION

La composición antigénica de los eritrocitos de un individuo es determinada por pruebas de aglutinación con antisueros apropiados. Las pruebas para el Rh, consisten en determinar si los eritrocitos de un individuo contienen el factor clásico y clínicamente más importante Rh se dice que alguna persona es Rh positiva si contiene este factor siendo donador, y negativo si es receptor.

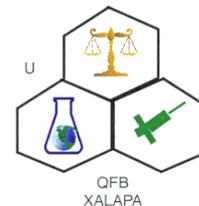
FUNDAMENTO TEORICO

Existen 2 teorías genéticas para explicar la multiespecificidad del complejo antigénico Rh. De acuerdo con la teoría de Fisher y Race, los antígenos Rh son determinados por tres pares de genes íntimamente ligados; la teoría propuesta por Wiener sugiere la existencia de un elevado número de genes alélicos en un locus que determina el complejo entero.

En la práctica, numerosos laboratorios emplean un término promedio entre las nomenclaturas. El antígeno Rh original es llamado antígeno D, y se acompaña por los productos génicos Cc y Ee. Probablemente el complemento de D no sea antigénico, o el gen d sea amórfico, puesto que nunca se ha encontrado anticuerpos contra d. En una población cualquiera estos antígenos no existen al azar, sino que tienen combinaciones preferentes. El genotipo probable puede inferirse mediante el uso de diferentes antisueros para determinar el fenotipo de Rh. El genotipo se describe por 2 conjuntos de letras (cDe/cDE) o por 2 letras (R₁ y R₂). Si en la prueba solo se emplea el suero anti-D, no es posible distinguir entre personas Rh-positivas, homocigotas o heterocigotas; esta distinción es de importancia clínica cuando se tipifica la sangre del padre en un caso de enfermedad hemolítica del recién nacido.

El antígeno de importancia clínica es el antígeno reconocido por el anticuerpo inmune de aloinmunización fetomaterna. Por lo tanto, el “Rhesus” empleado para designarlo es impropio, pero ya se utilizaba desde hace tanto tiempo que Levine propuso modificar la denominación del antígeno común al mono M. Rhesus y al hombre identificarlo por el xenoanticuerpo o por el raro aloanticuerpo humano, dándole a partir de esa fecha el nombre de antígeno LW, en honor a Landsteiner y Wiener. El nombre de anti-Rh, se reservó al aloanticuerpo a que se debe la enfermedad hemolítica del recién nacido.

Los sujetos cuyos eritrocitos resultan aglutinados por el aloanticuerpo anti-Rh (85 %), se consideran de fenotipo Rh-positivo o D⁺. El 15% restante de los sujetos negativos, se



consideran Rh⁻ o D⁻. Las técnicas de aglutinación artificial y la prueba de Coombs permitieron reconocer otros antígenos del sistema Rh: el antígeno C, presente en el 70% de los sujetos de raza blanca; el antígeno E, en el 30%. Los sujetos Rhesus negativos que tienen el antígeno C se considera Rh' y los que poseen el antígeno E Rh''.

La determinación habitual de Rh de los donantes y receptores de sangre incluye sólo un antígeno Rh (D). En los especímenes de D⁻ debería comprobarse siempre la presencia de D débil (antes llamado D^u). El término Rh₀-positivo o Rh₀-negativo se refiere a D⁺ o D⁻.

De los diversos antígenos Rh, el D es el inmunógeno más potente y por lo tanto el más importante. Provoca respuesta del anticuerpo con una frecuencia 50 veces mayor que los antígenos c y E. Si una unidad de sangre D positiva es transfundida a un receptor Rh negativo se producirá anti-D en 60-80% de los casos; se formará anti-c y anti-E en menos de 2% de las transfusiones incompatibles. Por esta causa, en la rutina de los bancos de sangre, sólo se determina el antígeno D y su presencia delimita la designación de Rh positivo o Rh negativo.

El antígeno D puede aparecer en la membrana de los eritrocitos en formas débiles, las cuales complican la tipificación de Rh. Estas variantes se denominan D^u y difieren del D "normal" en que tienen un número menor de sitios antigénicos. La detección de D^u requiere un antisuero potente y la técnica de Coombs. Si se localiza D^u, la sangre se considera Rh positivo si el paciente es donador, y como Rh negativa si es receptor.

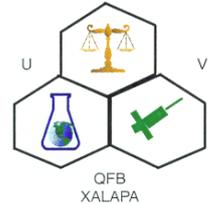
Pruebas positivas falsas:

Las pruebas positivas falsas pueden deberse al secado (período de observación que sobrepasa los 2 minutos), formación de pilas de monedas o autoaglutinación. Los antisueros Rh están potenciados con albumina para obtener la concentración de proteína óptima requerida para la clasificación del Rh. Si los hematíes del paciente están fuertemente revestidos con anticuerpos, la propia albumina puede producir aglutinación conduciendo ello a una reacción positiva falsa. Suspendiendo los hematíes en salina y volviendo a tipificar con antisueros salino-activos, generalmente se llega a la identificación globular correcta. Generalmente las aglutininas frías dan aglutinaciones espontáneas.

Pruebas negativas falsa:

Las pruebas negativas falsas se pueden deber a hematíes viejos (solamente se usarán hematíes recientes), a la errónea concentración de los hematíes, a hemolisis, a la mezcla inadecuada de los mismos, a suero de tipaje inactivo o a temperatura incorrecta. Los glóbulos variantes Rh₀ (D^u) pueden dar también una prueba negativa falsa.

Una prueba negativa falsa puede ser causada por existencia de anticuerpos bloqueantes a concentración lo bastante alta para impedir la aglutinación de los glóbulos, porque los sitios de unión de la superficie de los hematíes están ocupados. Los antisueros anti-D incompletos generalmente son negativos; si bien el anti-D salino algunas veces puede tipificar estos glóbulos, también esto puede ser imposible. Para prevenir la interferencia de



una isoaglutinina, puede eluirse el anticuerpo para liberar los sitios de unión y dar el tipaje del Rh correcto. El anticuerpo eluido puede luego identificarse. Un ejemplo de esta condición es la enfermedad hemolítica del recién nacido, en la cual los hematíes del niño están fuertemente recubiertos con anti-D materno.

MATERIAL

- Material necesario para la extracción de sangre o lanceta desechable
- 2 tubos de ensaye de 13 x 75
- 3 tubos de ensaye de 10 x 75
- Portaobjetos
- Aplicadores de madera
- Baño de agua a 37°C

MATERIAL BIOLÓGICO

- Sangre completa

REACTIVOS

- Suero clasificador anti-Rh (anti-D)
- Solución de albúmina bovina al 22%
- Suero antihumano
- Solución salina fisiológica

EQUIPO

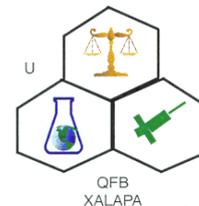
- Centrífuga

TÉCNICA

Puede utilizarse el método en portaobjetos o el método en tubo. En ambos casos una prueba control de albúmina bovina debe ser hecha en paralelo con cada prueba. En la prueba control una gota de solución de albúmina bovina al 22% es utilizada en lugar del suero anti-Rh. El control debe ser negativo (sin aglutinación) antes de que los resultados de la prueba puedan ser considerados válidos. La aglutinación en la prueba control indica la presencia de anticuerpos en los glóbulos rojos recubiertos o la formación de “rouleaux” de los glóbulos rojos bajo prueba. En este caso los glóbulos rojos deben ser lavados y reprobados utilizando la prueba salina en tubo.

MÉTODO EN PORTAOBJETOS

1. Preparar una suspensión al 40-50% de los glóbulos rojos en un suero de grupo normal compatible o en su propio plasma (sangre total también puede ser utilizada).
2. En un portaobjetos colocar una gota de suero anti-Rh.
3. Agregar una gota de la suspensión de los glóbulos rojos al 40-50% o una gota de sangre total.
4. Mezclar bien con un aplicador. Bascular el portaobjetos.



INTERPRETACIÓN:

Observar en la muestra la aparición de aglutinación, si esta aparece, se clasificará la sangre como Rh positivo. Las muestras que no presenten aglutinación deben mantenerse en observación durante no más de 2 minutos. No interpretar el secamiento de la periferia como indicativo de aglutinación.

La prueba es negativa si no se observa aglutinación.

NOTA: se puede probar sangre obtenida por punción digital directamente en el portaobjetos; la sangre sin anticoagulante debe ser mezclada rápidamente con el suero de prueba para evitar coagulación. No interpretar los hilos de fibrina como aglutinación.

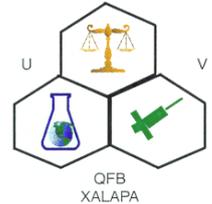
MÉTODO EN TUBO

- 1.- Preparar una suspensión al 5% de glóbulos rojos en un suero normal compatible, en su propio plasma o solución salina fisiológica.
- 2.- A un tubo de ensaye pequeño, agregar una gota de suero anti-Rh.
- 3.- Agregar una gota de la suspensión de glóbulos rojos al 5% o con uno aplicador transferir una cantidad equivalente de glóbulos rojos de la muestra de sangre total.
- 4.- Mezclar bien y centrifugar; la centrifugación sugerida es de aproximadamente 15 segundos a 3,400 rpm o un minuto a 1,000 rpm.
- 5.- Para facilitar la lectura después de la centrifugación, se puede agregar una gota de solución salina fisiológica.
- 6.- Resuspender los eritrocitos mediante ligera agitación y examinar para ver si hay aglutinación.
- 7.- Si la prueba es negativa (no se observa aglutinación), proceder al paso 4 de la prueba D^u con ambos tubos y tubos de control.

PROCEDIMIENTO PARA DETECCIÓN DE SANGRE D (débil)

D débil (antes D^u) es una variante del antígeno D, debe considerarse tan antigénico como el antígeno D. por lo tanto, las sangres que parecen ser Rh negativos por cualquier método de prueba, deben ser probadas posteriormente para el antígeno D^u por medio del procedimiento siguiente:

- 1.- Preparar una suspensión al 5% de glóbulos rojos en solución salina fisiológica, en su propio plasma o en un suero normal compatible.
- 2.- A un tubo de ensaye pequeño, agregar una gota de solución de albumina bovina al 22%, ese tubo sirve de control. Aun segundo tubo, agregar una gota de suero anti-Rh.
- 3.- A cada tubo de ensaye, agregar una gota de la suspensión de glóbulos rojos al 5%. Mezclar bien.
- 4.- Incubar ambos tubos (prueba y control) a 37°C por 15 minutos.
- 5.- Después de la incubación, lavar los glóbulos rojos de cada tubo 3 veces con tubos llenos



de solución salina fisiológica. Decantar totalmente después del último lavado.

6.- A cada tubo agregar 2 gotas de suero antihumano.

7.- Centrifugar.

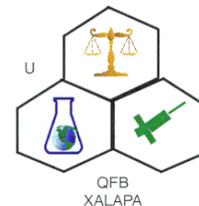
8.- Resuspender los eritrocitos mediante ligera agitación y examinar para ver si hay aglutinación.

INTERPRETACIÓN:

Si no hay aglutinación en ningún tubo, la sangre debe ser clasificada como Rh negativo. Cuando aparece aglutinación solamente en el tubo que recibió el suero anti-Rh, la sangre es de la variedad D^u y debe ser clasificada como Rh positivo.

Interprete la aglutinación en ambos tubos como prueba antiglobulínica (Coombs) directa positiva, indicando recubrimiento de los glóbulos rojos. Dichos glóbulos rojos no pueden ser probados con exactitud para el antígeno D^u. Si proviene de un donador, dicha sangre no puede ser utilizada para transfusión.

Los receptores con este resultado deben recibir sangre Rh negativa.



Laboratorio de Inmunología
Práctica 16
“PRUEBAS CRUZADAS “
Duración: 03 hr

OBJETIVO:

Conocer el fundamento de las pruebas cruzadas, para utilizarlas en las transfusiones sanguíneas.

INTRODUCCIÓN

Estas pruebas se fundamentan en la reacción del plasma o suero del receptor con los glóbulos rojos del donador (prueba mayor). En la prueba menor el suero o plasma del donador reacciona con los glóbulos rojos del receptor. En la prueba mayor, al reaccionar el suero del receptor con los hematíes del donador, si existe aglutinación, el candidato o donador no es adecuado para el paciente porque sus eritrocitos serían rápidamente aglutinados por anticuerpos existentes en la circulación del receptor. En la prueba menor, si no existe aglutinación al reaccionar el suero del donador con los hematíes del receptor, las dos sangres ensayadas son compatibles.

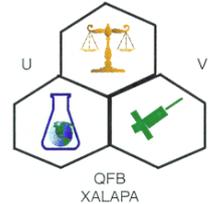
FUNDAMENTO TEORICO

Las pruebas cruzadas son realmente una transfusión *in vitro*, en donde se aprecia si es o no compatible la sangre o fracción de la sangre que se le aplicará al individuo, ya que a pesar de ser del mismo grupo sanguíneo del sistema ABO, puede haber anticuerpos de otros grupos sanguíneos que provoquen la incompatibilidad. Estas pruebas son dos, la prueba mayor y la prueba cruzada menor; es importante recordar que los anticuerpos se encuentran en el plasma y los antígenos en los glóbulos rojos. En la prueba mayor estamos verificando los anticuerpos del paciente (plasma o suero) que se encuentran en gran volumen, contra los glóbulos rojos que se van a transferir. Cualquier incompatibilidad (aglutinación o hemólisis) nos obliga a impedir que se aplique la transfusión.

En la prueba menor se verifica el plasma del donador que sera un volumen pequeño a transfundir, con los glóbulos rojos del receptor. Si hay incompatibilidad en esta prueba, puede transfundirse únicamente el paquete globular libre de plasma.

En el siguiente cuadro podemos observar la compatibilidad sanguínea relacionada con el sistema ABO:

GRUPO DEL DEL RECEPTOR	CONCENTRADO DE ERITROCITOS O SANGRE.			PLASMA		
	1	2	3	1	2	3
O	O	NINGUNO	NINGUNO	O	AB	A o B
A	A	O	NINGUNO	A	AB	O
B	B	O	NINGUNO	B	AB	O
AB	AB	B o A	O	AB	B o A	O



Las pruebas cruzadas deben de hacerse con sangre fresca, de preferencia sin anticoagulante.

Siempre debe comprobarse el grupo y Rh del paciente y del donador antes de hacer las pruebas cruzadas. Es mejor que la sangre que se pretende transfundir sea del mismo grupo ABO que el paciente.

Algunas pruebas pueden dar falsamente negativas debido a:

- a) Uso de plasma o suero viejo en el procedimiento sanguíneo cruzado.
- b) Uso de una suspensión celular densa.
- c) Centrífugas mal calibradas.
- d) Incubadora a temperatura inapropiada.

Por lo tanto, podemos ver que las pruebas cruzadas son una técnica bastante útil para poder o no realizar una transfusión sanguínea.

MATERIAL

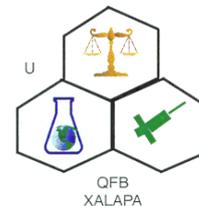
- Material necesario para extracción de sangre (donador y receptor)
- 6 tubos de ensaye de 13 x 75 (serología)
- 2 tubos de ensaye de 13 x 100
- 6 tubos de ensaye de 12 x 75 (hemólisis)
- 2 pipetas Pasteur con bulbo de hule
- 2 pipetas graduadas de 1 ml y de 5 ml
- Portaobjetos

MATERIAL BIOLÓGICO

- Eritrocitos del donador y del receptor
- Suero sanguíneo del donador y del receptor

REACTIVOS

- Solución salina isotónica
- Anticoagulante (EDTA al 10%)
- Suero antihumano (Coombs)
- Albúmina bovina al 22%
- Células control de Coombs
- Suero hemotipificador anti-A
- Suero hemotipificador anti-B
- Suero hemotipificador anti-AB
- Suero hemotipificador anti-Rh



EQUIPO

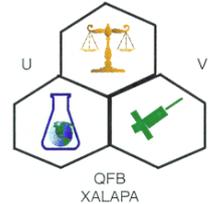
- Centrífuga
- Microscopio
- Baño de agua a 37°C

TÉCNICA:

- 1.- Utilizar sangre recién extraída del receptor y del donador, que ha sido colocada una parte de ella con anticoagulante (1.5 ml) y otra se ha dejado coagular (2 ml) para obtener suero. Rotular claramente los tubos.
- 2.- Determinar el grupo sanguíneo ABO y Rh del donador y receptor.
- 3.- Preparar suspensiones al 2% en solución salina de eritrocitos lavados, tanto del donador como del receptor.
- 4.- Disponer 6 tubos de ensayo de 12 x 75, bien limpios y secos, numerarlos y montar la prueba de acuerdo con el siguiente esquema, tomando en cuenta que el tubo número 1 es la fase salina y el numero 2 la fase albuminosa de la prueba cruzada mayor; el tubo numero 3 corresponde a la fase salina y el numero 4 a la fase albuminosa de la prueba cruzada menor; los tubos numero 5 y 6 son los controles salino y albuminoso respectivamente.

Tubo numero:	P.C	Mayor	P.C	Menor	Controles	
	1	2	3	4	5	6
Suero del receptor	2 gotas	2 gotas	-----	-----	2 gotas	2 gotas
Suero del donador	-----	-----	2 gotas	2 gotas	-----	-----
Susp. Eritrocitos de donador	1 gota	1 gota	-----	-----	-----	-----
Susp. Eritrocitos del receptor	-----	-----	1 gota	1 gota	1 gota	1 gota
Albúmina al 22%	-----	2 gotas	-----	2 gotas	-----	2 gotas

- 5.- Mezclar por agitación suave. Centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto. Remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación o hemólisis. Anotar.
- 6.- Incubar los tubos 1, 3 y 5 durante 15 minutos a temperatura ambiente y los tubos 2, 4 y 6 durante 15 minutos a 37 °C.
- 7.- Centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto, leer y anotar si no hay aglutinación o hemólisis continuar la prueba.
- 8.- Lavar 3 veces los eritrocitos de los 6 tubos, con tubos llenos de solución salina isotónica.
- 9.- Después del tercer lavado, retirar lo más posible el sobrenadante, volver a suspender los hematíes en la gota de solución salina que haya quedado y agregar una gota de suero antihumano (Coombs) a cada tubo. Agitar suavemente para mezclar y centrifugar a 1,000 rpm durante 1 minuto. Observar y anotar, (macro y microscópicamente).
- 10.- A los tubos que den resultado negativo, agregarles una gota de células control de Coombs, mezclar, centrifugar 1 minuto a 1000 rpm y observar. El resultado debe ser positivo para darle validez a la prueba; de lo contrario, la prueba debe repetirse nuevamente.

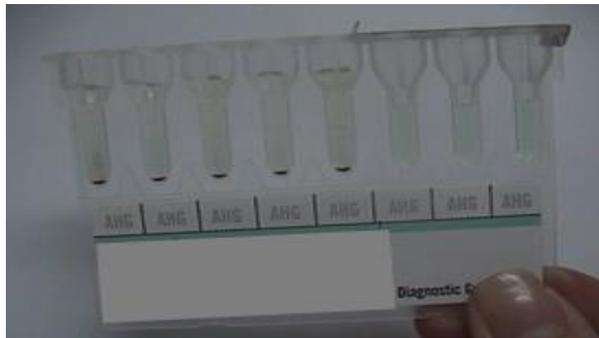


INTERPRETACIÓN:

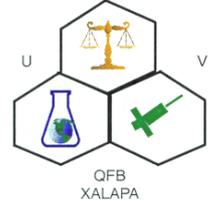
La aparición de aglutinación o hemólisis en un tubo en cualquier fase, con autocontrol negativo, indica incompatibilidad. Debe buscarse otra sangre y hacerle pruebas cruzadas.

Técnica para células control de Coombs

1. En un tubo de ensaye, se ponen dos gotas de glóbulos rojos “O”, cuatro gotas de solución salina y dos gotas de suero anti-D.
2. Se incuba el tubo a 37°C durante 30 minutos.
3. Lavar en tres ocasiones con solución salina a 3, 400 r p m, durante 15 segundos en cada ocasión.
4. Para probar que los eritrocitos se encuentran sensibilizados, se toma una gota de la mezcla en otro tubo y se le agrega una gota del reactivo de Coombs, se centrifuga a 3400 y si se aglutinan, están listos para usarse.
5. Se agrega una gota de los glóbulos rojos O sensibilizados a cada uno de los tubos en que se realizó el Coombs en las pruebas cruzadas.
6. Se centrifugan y se observa si existe aglutinación



Pruebas de Coombs en Gel



Laboratorio de Inmunología
Práctica 17
“PRUEBA DE COOMBS DIRECTA”
Duración: 02 hr

OBJETIVO:

Detectar inmunoglobulinas unidas a la superficie de los glóbulos rojos mediante la prueba de Coombs directa.

INTRODUCCIÓN

La detección de inmunoglobulinas o complemento, fijados en forma relativamente irreversible a la superficie de los eritrocitos, se basa en la aglutinación que se produce al mezclarse los hematíes revestidos con Ig o complemento y el suero de Coombs, el cual provoca una reacción de aglutinación visible.

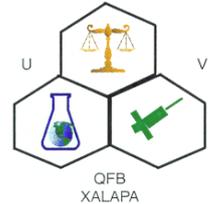
FUNDAMENTO TEORICO

La prueba de Coombs directa detecta el anticuerpo (prueba de la antiglobulina) y el complemento (prueba de la anti-no globulina γ) sobre los hematíes respectivamente. Estas pruebas utilizan antisuero de conejo, uno para la Ig (inmunoglobulina) y el otro para el C (complemento).

Se ha observado que los anticuerpos eluidos de estas células tienen una especificidad por los antígenos del grupo sanguíneo de los hematíes y una capacidad para fijar el complemento, por lo cual son responsables del complemento presente sobre los hematíes en la prueba directa anti-no globulina γ .

Cuando se obtiene con el suero antiglobulina habitual de amplio espectro, una prueba positiva de Coombs, ésta indica la adherencia a la membrana de los eritrocitos de gammaglobulina, componentes del complemento, transferrina, un complejo de ciertos medicamentos y gammaglobulina o posiblemente otras globulinas. Una prueba directa de Coombs “débil”, sin hemólisis clínica, se puede encontrar ocasionalmente en una variedad de padecimientos clínicos no relacionados, por ejemplo, artritis reumatoidea, colitis ulcerativa y leucemia. La información clínica apropiada y unas cuantas pruebas serológicas, usualmente llevan al diagnóstico correcto. Como se practica de manera sistemática una prueba positiva directa de Coombs, requiere de más de 500 moléculas de IgG/eritrocito (normal < 35/eritrocito). Aproximadamente el 5% de los enfermos con anemia autoinmunitaria hemolítica tienen sólo 50-500 moléculas/eritrocito y, por lo tanto, dan una prueba de Coombs negativa falsa.

La enfermedad hemolítica del recién nacido es una afección inmunológica clásica provocada por la destrucción acelerada de los eritrocitos del niño por anticuerpos específicos que proceden de la madre, llegados a través de la placenta. El proceso hemolítico es máximo en el momento de nacer, y disminuye a medida que la concentración de anticuerpos se reduce en la circulación infantil. Como la IgG atraviesa la barrera placentaria, pero no así la



IgM, esta no participa en la enfermedad. Cualquier antígeno de grupo sanguíneo capaz de estimular niveles elevados de IgG puede ser causa de la enfermedad. Sin embargo, es clásica su observación en caso de incompatibilidad Rh e incompatibilidad ABO, siendo más grave la primera afección.

La anemia es probablemente el resultado de una hemolisis extravascular. En un feto nacido muerto, se encuentra con frecuencia eritro-fagocitosis marcada en el sistema reticuloendotelial, especialmente en el bazo. Como resultado de la anemia, se puede encontrar gran cantidad de células nucleadas y reticulocitos en la sangre periférica; por tanto, este estado se ha denominado eritroblastosis fetal.

Suspensiones salinas de glóbulos rojos Rh₊ se incuban con antisuero Rh, se lavan con solución salina y se mezclan con suero antiglobulina humana. El anticuerpo Rh se combina primero específicamente con su aglutinante homólogo y luego, como globulina, reacciona con la antiglobulina y aglutina a los eritrocitos. La sensibilización *in vivo* de los eritrocitos de un lactante eritroblastósico mediante anticuerpos Rh materno adquirido pasivamente, es descubierta por la prueba directa de Coombs (antiglobulina). Eritrocitos del bebe perfectamente lavados, se suspenden en solución salina y se agrega suero antiglobulina humana. Se produce siempre aglutinación en la eritroblastosis típica causada por anticuerpos Rh o hr.

MATERIAL

- Material necesario para extracción de sangre
- 2 tubos de ensaye de 13 x 75 (serología)
- 3 tubos de ensaye de 12 x 75 (hemolisis)
- Pipeta Pasteur con bulbo
- Pipetas graduadas de 1 y de 10 ml
- Portaobjetos

MATERIAL BIOLÓGICO

- Eritrocitos del paciente

REACTIVOS

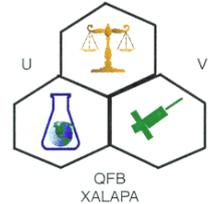
- Solución salina isotónica
- Suero antihumano (suero de Coombs)
- Células control de Coombs

EQUIPO

- Centrífuga
- Microscopio

TÉCNICA

- 1.- Obtenga sangre del paciente (2ml) y colóquela en un tubo con anticoagulante, mezclar.
- 2.- Prepare una suspensión de glóbulos rojos al 2% con solución salina. Los glóbulos rojos



deben lavarse previamente 4 o 5 veces con solución salina isotónica, con el objeto de eliminar las proteínas.

3.- Colocar en un tubo de ensayo de 12 x 75 dos gotas de suero antihumano, añadir 2 gotas de la suspensión de hematíes, mezclar cuidadosamente y dejar reposar 5 minutos a temperatura ambiente.

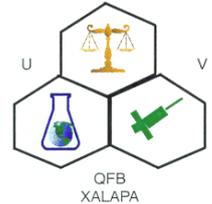
4.- Centrifugar 1 minuto a 1,500 rpm o 15 segundos a 3,400 rpm.

5.- Desprender suavemente el botón y observar macro y microscópicamente si existe aglutinación.

6.- si el resultado es negativo (no existe aglutinación) agregar dos gotas de células control de Coombs, mezclar, centrifugar igual que en el paso número 4 y observar la aglutinación. Esta debe existir para verificar que la prueba se realizó correctamente y que el suero de Coombs funciona adecuadamente.

INTERPRETACIÓN:

- a) Las pruebas directas de antiglobulina son positivas con frecuencia en lactantes con enfermedad hemolítica del recién nacido (eritroblastosis fetal), en pacientes con anemia hemolítica autoinmune y en receptores de transfusiones de sangre incompatibles.
- b) También suele ser positiva en pacientes que ingieren ciertos tipos de medicamentos (por ejemplo: penicilina y metildopa).



Laboratorio de Inmunología
Práctica 18
“PRUEBA DE COOMBS INDIRECTA“
Duración: 03 hr

OBJETIVO:

Detectar la presencia de anticuerpos circulantes contra los antígenos de los hematíes, mediante la prueba de Coombs indirecta.

INTRODUCCION:

La prueba de Coombs indirecta es una reacción en 2 etapas, el suero en el que se buscan los anticuerpos se incuban primero con los eritrocitos de prueba y luego los eritrocitos recubiertos por el supuesto anticuerpo son aglutinados por un suero antiglobulínico de Coombs.

FUNDAMENTO TEORICO :

En la prueba de Coombs indirecta, el suero del paciente debe incubarse con los hematíes del mismo grupo sanguíneo para evitar falsos debido a incompatibilidad, y después se practica la prueba antiglobulina sobre estos hematíes. La aglutinación confirma la presencia de anticuerpos contra los antígenos de los hematíes.

Las mayores aplicaciones de las pruebas de Coombs incluyen la tipificación de los eritrocitos en los bancos de sangre, la evaluación de la enfermedad hemolítica del recién nacido y el diagnóstico de la anemia hemolítica autoinmunitaria. En la anemia hemolítica inducida por la penicilina, el paciente tiene una prueba de Coombs directa positiva, mientras recibe penicilina; pero la prueba indirecta de la antiglobulina dará negativa usando hematíes del mismo tipo que los del paciente. Sin embargo, el suero del paciente aglutinará estos hematíes de la prueba indirecta si se revisten con penicilina. La prueba positiva indirecta de Coombs, indica un exceso de anticuerpos. En un paciente que ha sido transfundido recientemente (en un lapso de pocas semanas) una prueba de Coombs positiva debe interpretarse cuidadosamente. Las células recubiertas pueden ser células incompatibles del donador en un paciente que tenga anticuerpos de una transfusión previa. Esta incompatibilidad da lugar ocasionalmente a reacciones transfusionales retardadas (alrededor de 4 a 14 días), que pueden simular una anemia hemolítica autoinmunitaria. Se puede presentar hemólisis, sin anticuerpos (prueba de Coombs negativa), en uremia, cirrosis, vasculitis difusa, cáncer y ciertas infecciones bacterianas.

MATERIAL

- Material necesario para extracción de sangre
- 2 tubos de ensaye de 13 x 75 (serología)
- 2 tubos de ensaye de 12 x 75 (hemólisis)
- Pipeta Pasteur con bulbo
- Pipetas graduadas de 1 y de 10 ml



- Portaobjetos

MATERIAL BIOLÓGICO

- Suero del paciente
- Eritrocitos del grupo “O” Rh positivo

REACTIVOS

- Solución salina isotónica
- Suero antihumano (suero de Coombs)
- Células control de Coombs

EQUIPO

- Centrífuga
- Microscopio
- Baño de agua con control de temperatura

TÉCNICA

- 1.- Extraer sangre del paciente (2ml), colocarla en un tubo y dejarla coagular para obtener el suero; por otro lado, obtener sangre grupo “O” Rh positiva y colocarla en un tubo con anticoagulante
- 2.- Preparar una suspensión a los 2% en solución salina isotónica de eritrocitos del grupo O Rh positivos previamente lavados con solución salina.
- 3.- En un tubo de 12 x 75 colocar dos gotas del suero del paciente y añadir dos gotas de la suspensión de eritrocitos. Mezclar.
- 4.- Incubar esta mezcla de 30 minutos a 2 horas en baño de agua a 37°C. Observar si existe aglutinación.
- 5.- Si no hay aglutinación lavar los eritrocitos tres veces con solución salina isotónica y decantar todo el sobrenadante.
- 6.- Agregar dos gotas de solución salina y dos gotas de suero antihumano. Mezclar.
- 7.- Dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente, centrifugar durante 1 minuto a 1,500 rpm o 15 segundos a 3,400 rpm y observar macro y microscópicamente si hay aglutinación.
- 8.- Si no hay aglutinación, agregar el suero control de Coombs, y mezclar; centrifugar como se indica en el paso anterior y observar. Este paso es sólo un control cuyo resultado debe ser positivo pues verifica que la prueba se realizó correctamente y que el suero de Coombs funciona adecuadamente.

INTERPRETACIÓN

Prueba (+).- La aglutinación confirma la presencia de anticuerpos contra los antígenos de los hematíes.

Prueba (-).- No se produce aglutinación, lo cual indica ausencia de anticuerpos contra los antígenos de los hematíes; en algunos casos puede presentarse hemólisis.



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



ANEXO 1.

PLAN DE MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICOS INFECCIOSOS

INTRODUCCIÓN

De acuerdo con el Plan General 2030 de la Universidad Veracruzana, es necesaria una universidad socialmente responsable, comprometida con la cultura de la sustentabilidad y donde impere un compromiso con el cuidado del medio ambiente. Acorde con ello, la Facultad de QFB cuenta con un **Plan de Manejo de Residuos Peligrosos** como herramienta para definir los procedimientos técnicos y administrativos necesarios para el manejo de los residuos peligrosos generados en cada uno de los laboratorios de la Facultad de QFB.

Encargados del Programa:

MIC Izmit Camacho de la Cerda, Dra. Abril de los A. Aguilar Tirado, MC Mauro A. Villanueva Lendechy, QFB Ma. del Refugio López Cruz, Dra. Isabel Pérez Lozano, MC María Edith Riaño Sánchez.

OBJETIVO

Establecer los procedimientos técnicos y administrativos necesarios dentro de la Facultad de QFB para el manejo integral de los residuos peligrosos de acuerdo a la normatividad vigente, con el fin de prevenir el daño al medio ambiente y a la salud humana de acuerdo al compromiso como “Universidad Social y Ambientalmente Responsable

META

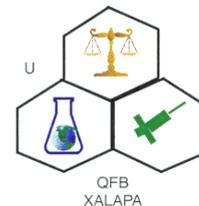
La meta es que la disposición de los residuos peligrosos dentro de la Facultad de QFB se realice de acuerdo con este Plan de Manejo, dando como resultado el cumplimiento de la normativa vigente y el control sobre los impactos ambientales significativos.

ALCANCE

Este plan es aplicable a todos los laboratorios y áreas de trabajo de la facultad de QFB, desde estudiantes hasta el correspondiente personal académico, técnico, administrativo y manual que intervenga en dichas áreas de trabajo.

MARCO LEGAL

El sistema jurídico mexicano está constituido por las disposiciones constitucionales, Leyes Generales y Federales, Reglamentos y Normas Oficiales Mexicanas.



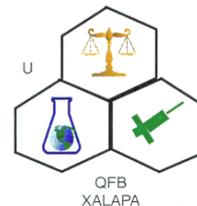
Todo lo descrito en el presente plan estará en estricto apego a las políticas institucionales y a la Normatividad Oficial Mexicana en materia de Residuos Peligrosos. A continuación se enlistan las leyes y normas aplicables.

NORMATIVIDAD APLICABLE A LOS RESIDUOS QUÍMICOS PELIGROSOS

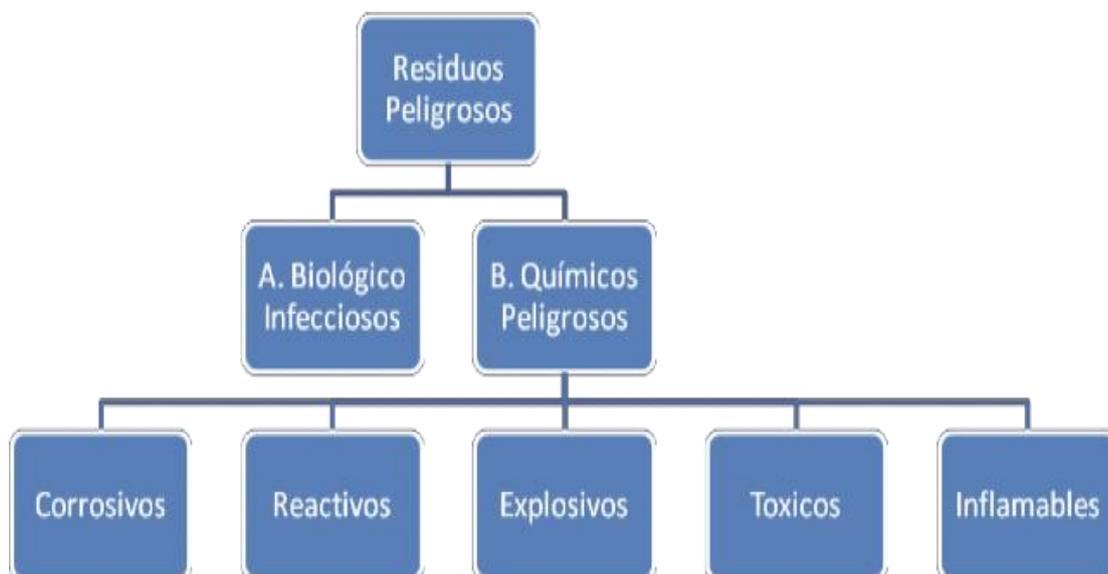
- Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.
- Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
- Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
- Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos.
- Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Evaluación del Impacto Ambiental.
- Norma Oficial Mexicana NOM-052-SEMARNAT-2005. Establece las características, el proceso de identificación, clasificación y los Residuos Peligrosos
- Norma Oficial Mexicana NOM-053-SEMARNAT-1993. Establece el procedimiento para llevar a cabo la prueba de extracción para determinar los constituyentes que hacen un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.
- Norma Oficial Mexicana NOM-054-SEMARNAT-1993. Establece el procedimiento para determinar la incompatibilidad entre dos o más residuos considerados como peligrosos por la NOM-052- SEMARNAT- 1993.
- Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental, salud ambiental, y Residuos Peligrosos Biológico Infecciosos. Clasificación y especificaciones de Manejo.

9. CONCEPTOS BÁSICOS

<p>¿Qué es un Residuo?</p>	<p>Un residuo es todo material o producto que se desecha y que se encuentra en estado sólido, semisólido, líquido o gaseoso, contenido en recipientes o contenedores, es decir, cualquier material que ya no sea útil a la persona que lo empleaba, producto de reacciones y/o como resultado de las prácticas de laboratorio; incluye cualquier insumo o materia prima caducada o que haya perdido las características por las cuales fue adquirido. Dicho residuo puede ser susceptible de ser valorizado o sujetarse a tratamiento o disposición final, conforme a lo dispuesto en la LGPGIR y demás ordenamientos que de ella derive. Se pueden clasificar en: BiológicoInfecciosos Y QuímicosPeligrosos</p>
<p>¿Qué es un Residuo Químico Peligroso?</p>	<p>Es aquella sustancia química que posea alguna de las características de corrosividad (C), reactividad (R), explosividad (E), toxicidad (T) e inflamabilidad (I), o que contengan agentes que le confieran peligrosidad; así como envases, recipientes, embalajes y suelos que hayan sido contaminados cuando se transfieran a otro sitio, de conformidad con lo que se establece en la LGPGIR.</p>
<p>¿Qué implicaciones</p>	<p>Su forma de manejo depende de cada propiedad y demanda conocer el</p>

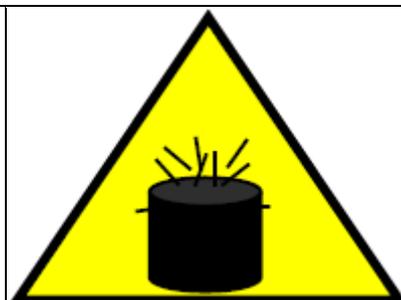


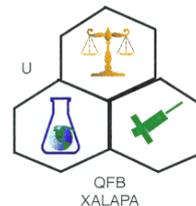
tienen las propiedades de los residuos?	tipo de precauciones a seguir, de envases a emplear, de almacenamiento que requieren, de equipos de protección con los que hay que contar, así como de materiales a emplear para amortiguar derrames o apagar incendios.
¿Qué es un Residuo Biológico Infeccioso?	Es cualquier material que contenga agentes biológico-infecciosos es decir, con cualquier microorganismo capaz de producir enfermedades cuando está presente en concentraciones suficientes, en un ambiente propicio, en un hospedero susceptible, en presencia de una vía de entrada y que puedan causar efectos nocivos a la salud y al ambiente.



REACTIVO (R)

Cuando una muestra representativa en estado líquido o sólido, después de ponerse en contacto con el aire se inflama en un tiempo menor a 5 min, sin que exista una fuente externa de ignición. Cuando se pone en contacto con agua reacciona espontáneamente y genera gases inflamables en una cantidad mayor a 1 L/kg del residuo por hora. Posee en su constitución cianuros o sulfuros liberables, cuando se expone a condiciones ácidas.





EXPLOSIVO (E)

Cuando una muestra representativa tiene una constante de explosividad, mayor o igual al nitrobenzeno. Es capaz de producir una reacción o descomposición detonante o explosiva a 25°C y a 1.03 kg/cm² de presión.



TÓXICO (T)

Cuando la muestra representativa se somete a la prueba de extracción para toxicidad conforme a la norma oficial mexicana NOM-053-SEMARNAT- 1993, el lixiviado contiene cualquiera de los constituyentes listados en las tablas 5, 6 y 7, en concentraciones mayores a los límites señalados en dichas tablas, *por ejemplo: Arsénico 5.0 mg/L, Níquel*

5.0 mg/L, Mercurio 0.2 mg/L, Plata 5.0 mg/L, Cloroformo

6.0 mg/L, Fenol 14.4 mg/L.



INFLAMABLE (I)

Cuando una solución acuosa contiene más del 24% de alcohol en volumen. Cuando es un líquido y tiene un punto de inflamación inferior a 60°C. Cuando no es líquido, pero es capaz de provocar fuego por fricción, absorción de humedad o cambios químicos espontáneos (a 25°C y a 1.03 kg/cm²). O bien, se trata de gases comprimidos inflamables o agentes oxidantes que estimulan

la combustión.





DESCRIPCION DEL PLAN DE MANEJO DE RESIDUOS PELIGROSOS

LABORATORIO 101 LABORATORIO 102 LABORATORIO 103 LABORATORIO 104
LABORATORIO 105 LABORATORIO DE TECNOLOGÍA FARMACÉUTICA

Residuos Químicos Peligrosos Residuos Químicos Peligrosos Residuos Químicos Peligrosos
y RPBI Residuos Químicos Peligrosos y RPBI RPBI

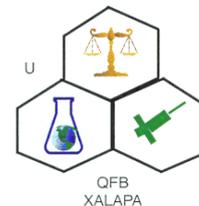
IDENTIFICACIÓN DE LOS PUNTOS DE GENERACION DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS EN LA FACULTAD DE QFB

La identificación de residuos peligrosos de tipo químico se realizará tomado en cuenta que una sustancia ha perdido sus características intrínsecas, sus propiedades han dejado de ser útiles para el usuario, se encuentran fuera de especificaciones, han caducado, así como las sustancias químicas que han perdido, carecen o presentan variación en sus características intrínsecas para ser utilizadas, transformadas respecto a los estándares de diseño o producción originales, por lo que se deben manejar como residuos con “características peligrosas”. Un residuo es considerado peligroso (de acuerdo con la normatividad vigente), cuando independientemente de su estado físico presenta alguna o más de las características de peligrosidad como Corrosividad, Explosividad, Toxicidad e Inflamabilidad. Es importante reconocer la diferencia entre un residuo y una sustancia, con la finalidad de que en las segundas, sean aprovechadas al máximo sus propiedades químicas originales y no se desechen cuando éstas aún no han sido agotadas ya que no serían consideradas como residuos. Una sustancia tóxica es aquella que puede producir en organismos vivos, lesiones, enfermedades, implicaciones genéticas o muerte. Un residuo es cualquier material generado en los procesos de extracción, beneficio, transformación, producción, consumo, utilización, control o tratamiento cuya calidad no permita usarlo nuevamente en el proceso que lo generó.

CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS A) QUÍMICOS

Para poder saber si los residuos que se generan en cualquier actividad, son o no peligrosos, existe un procedimiento, el cual se detalla a continuación:

1.- Un residuo es peligroso, si está listado en el Artículo 31 de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos (LGPGIR), la cual define a los siguientes residuos peligrosos: Aceites lubricantes usados, Disolventes orgánicos usados, Convertidores catalíticos, Sustancias o mezcla de sustancias con metales pesados como plomo, Baterías a base de mercurio o de níquel-cadmio, Lámparas fluorescentes y de vapor de mercurio, Aditamentos que contengan mercurio, cadmio o plomo, Fármacos, Plaguicidas y sus envases, que contengan remanentes de los mismos, Compuestos orgánicos persistentes como los bifenilos policlorados, Lodos de perforación base aceite, provenientes de la extracción de combustibles fósiles y lodos provenientes de plantas de tratamiento de aguas residuales cuando sean considerados como peligrosos.



2.- Si el residuo no se clasifica como peligroso en el Artículo 31 de la LGPGIR, se debe consultar en los cinco listados de la Norma Oficial Mexicana NOM- 052-SEMARNAT-2005, que establece las características, procedimiento de identificación, clasificación y los listados de los residuos peligrosos (residuos químicos peligrosos por fuente específica o no específica, residuos peligrosos resultado del desecho de productos químicos fuera de especificaciones o caducos (Tóxicos Agudos y crónicos) y residuos sujetos a Condiciones Particulares de Manejo o bien se puede determinar su peligrosidad mediante el análisis CRETI que se realiza, a fin de identificar si el residuo presenta cualquiera de las siguientes características; Corrosividad, Reactividad, Explosividad, Toxicidad ambiental, Inflamabilidad. Es importante mencionar que la identificación de las características de explosividad es mediante revisión bibliográfica.

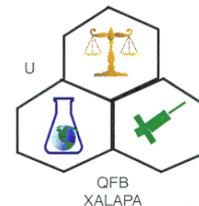
3.- Para la elaboración de listados dentro de la facultad, además deberán enlistarse de la siguiente forma:

- Sustancias ácidas
- Sustancias básicas
- Sustancias inorgánicas sólidas
- Sustancias inorgánicas líquidas
- Sustancias orgánicas sólidas
- Sustancias orgánicas líquidas
- Solventes
- Plaguicidas
- Metales Pesados

CLASIFICACIÓN DE RESIDUOS PELIGROSOS B) BIOLÓGICO INFECCIOSOS

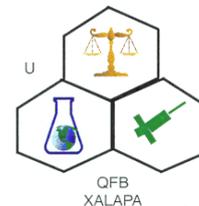
Para efectos de la NOM 087 se consideran residuos peligrosos biológico- infecciosos los siguientes:

- La sangre
- La sangre y los componentes de ésta, sólo en su forma líquida, así como los derivados no comerciales, incluyendo las células progenitoras, hematopoyéticas y las fracciones celulares o acelulares de la sangre resultante (hemoderivados).
- Los cultivos y cepas de agentes biológico-infecciosos
- Los cultivos generados en los procedimientos de diagnóstico e investigación, así como los generados en la producción y control de agentes biológico- infecciosos.
- Utensilios desechables usados para contener, transferir, inocular y mezclar cultivos de agentes biológico-infecciosos.
- Los patológicos
- Los tejidos, órganos y partes que se extirpan o remueven durante las necropsias, la cirugía o algún otro tipo de intervención quirúrgica, que no se encuentren en formol.



- Las muestras biológicas para análisis químico, microbiológico, citológico e histológico, excluyendo orina y excremento.
- Los cadáveres y partes de animales que fueron inoculados con agentes enteropatógenos en centros de investigación y bioterios.
- Los residuos no anatómicos
 Son residuos no anatómicos los siguientes:
 - Los recipientes desechables que contengan sangre líquida.
 - Los materiales de curación, empapados, saturados, o goteando sangre o cualquiera de los siguientes fluidos corporales: líquido sinovial, líquido pericárdico, líquido pleural, líquido Céfal-Raquideo o líquido peritoneal.
 - Los materiales desechables que contengan esputo, secreciones pulmonares y cualquier material usado para contener éstos, de pacientes con sospecha o diagnóstico de tuberculosis o de otra enfermedad infecciosa según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.
 - Los materiales desechables que estén empapados, saturados o goteando sangre, o secreciones de pacientes con sospecha o diagnóstico de fiebres hemorrágicas, así como otras enfermedades infecciosas emergentes según sea determinado por la SSA mediante memorándum interno o el Boletín Epidemiológico.
 - Materiales absorbentes utilizados en las jaulas de animales que hayan sido expuestos a agentes enteropatógenos.
 - Los objetos punzocortantes
 - Los que han estado en contacto con humanos o animales o sus muestras biológicas durante el diagnóstico y tratamiento, únicamente: tubos capilares, navajas, lancetas, agujas de jeringas desechables, agujas hipodérmicas, de sutura, de acupuntura y para tatuaje, bisturís y estiletes de catéter, excepto todo material de vidrio roto utilizado en el laboratorio, el cual deberá desinfectar o esterilizar antes de ser dispuesto como residuo municipal.

TIPO DE RESIDUOS	ESTADO FISICO	ENVASADO	COLOR
4.1 Sangre	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.2 Cultivos y cepas de agentes infecciosos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
4.3 Patológicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Amarillo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Amarillo
4.4 Residuos no anatómicos	Sólidos	Bolsas de polietileno	Rojo
	Líquidos	Recipientes herméticos	Rojo
4.5 Objetos punzocortantes	Sólidos	Recipientes rígidos polipropileno	Rojo



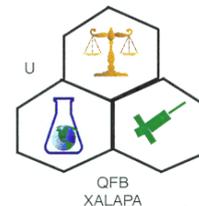
En las áreas de generación se deberán separar y envasar todos los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con sus características físicas y biológicas infecciosas, conforme a la tabla. Durante el envasado, los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deberán mezclarse con ningún otro tipo de residuos municipales o peligrosos.

1. Las bolsas deberán ser de polietileno de color rojo traslúcido de calibre mínimo 200 y de color amarillo traslúcido de calibre mínimo 300, impermeables y con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, además deberán estar marcadas con el símbolo universal de riesgo biológico y la leyenda Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos.
2. Las bolsas se sellarán al 80 por ciento (80%) de su capacidad, cerrándose antes de ser transportadas al sitio de almacenamiento temporal y no podrán ser abiertas o vaciadas.
3. Los recipientes de los residuos peligrosos punzocortantes deberán ser rígidos, de polipropileno color rojo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, que permitan verificar el volumen ocupado en el mismo, resistentes a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructibles por métodos físicos, tener separador de agujas y abertura para depósito, con tapa(s) de ensamble seguro y cierre permanente, deberán contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS PUNZOCORTANTES BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.
4. Los recipientes de los residuos peligrosos líquidos deben ser rígidos, con tapa hermética de polipropileno color rojo o amarillo, con un contenido de metales pesados de no más de una parte por millón y libres de cloro, resistente a fracturas y pérdidas de contenido al caerse, destructible por métodos físicos, deberá contar con la leyenda que indique "RESIDUOS PELIGROSOS LÍQUIDOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

ALMACENAMIENTO RPBI

- Se deberá destinar un área en la facultad para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos. Los residuos peligrosos biológico-infecciosos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico con tapa y ser rotulados con el símbolo universal de riesgo biológico, con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO- INFECCIOSOS".
- Los residuos patológicos, humanos o de animales (que no estén en formol) deberán conservarse a una temperatura no mayor de 4°C (cuatro grados Celsius), en las áreas de patología, o en almacenes temporales con sistemas de refrigeración o en refrigeradores en áreas que designe el responsable del establecimiento generador dentro del mismo.

14. MEDICIÓN	
Unidades de medición	La medición se realizará de acuerdo al estado del residuo, es decir, si es sólido será en gramos y kilogramos; si es líquido será en mililitros y litros.



Frecuencia	Los residuos se recolectarán al final de cada práctica de laboratorio, se almacenarán temporalmente en el área destinada para ello y posteriormente se procederá al trámite de su retiro de manera semestral en el caso de los Residuos Químicos, para el caso de los Residuos RPBI el retiro se efectuará semanalmente.
Confinamiento	Específico para cada laboratorio y área de refrigeración de la Facultad de QFB.

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE INTERNO

La recolección y transporte interno de los residuos químicos peligrosos, así como de los residuos peligrosos biológico infecciosos, hacia el área de almacenamiento temporal, se encuentra a cargo de los técnicos académicos de la Facultad de cada uno de los laboratorios, y es realizada al término de cada práctica de laboratorio. Para la recolección se deben utilizar los contenedores y las etiquetas de recolección específicos para este tipo de residuos, que cumplan con las características de seguridad y que sean confiables para el desarrollo de los trabajos de recolección y transporte interno hacia el área de almacenamiento. El personal a cargo de la recolección interna de residuos peligrosos químicos, deberá tener conocimiento de las características de los residuos que maneja, de tal forma que responda adecuadamente durante una contingencia o un posible accidente de derrame con este tipo de residuos, independientemente que deberá de reportar el incidente de forma inmediata al área generadora, así como a quien corresponda, con la finalidad de establecer un plan de contingencia. Debe portar equipo de seguridad consistente cuando menos de: bata u overol, guantes adecuados al tipo de residuo manejado, zapatos cerrados y lentes de protección. Si se recolectan gases, deberá utilizar la mascarilla con filtro de aire. Se deberá evitar recolectar al mismo tiempo residuos que sean incompatibles entre sí, para prevenir accidentes.

Los residuos sólidos peligrosos serán almacenados en el Sitio de Almacenamiento Temporal de Residuos Peligrosos que deberá cumplir con las exigencias mínimas, por un período no mayor a 6 meses, en condiciones seguras y con la segregación necesaria para garantizar condiciones de seguridad.

Estas exigencias mínimas tienen relación con:

- No verter residuos en lugares no autorizados o no especificados para ese tipo de residuo.
- Desechar los residuos en forma diferenciada y debidamente identificados.
- Uso obligatorio de los elementos de protección personal.

El sitio de almacenamiento temporal de residuos peligrosos tendrá las siguientes características:

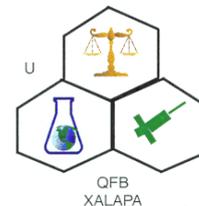


Condiciones básicas para las áreas de almacenamiento, consistentes en:

- a) Estar separadas de las áreas de producción, servicios, oficinas y de almacenamiento de materias primas o productos terminados;
- b) Estar ubicadas en zonas donde se reduzcan los riesgos por posibles emisiones, fugas, incendios, explosiones e inundaciones;
- c) Contar con dispositivos para contener posibles derrames, tales como muros, pretilas de contención o fosas de retención para la captación de los residuos en estado líquido o de los lixiviados;
- d) Cuando se almacenan residuos líquidos, se deberá contar en sus pisos con pendientes y, en su caso, con trincheras o canaletas que conduzcan los derrames a las fosas de retención con capacidad para contener una quinta parte como mínimo de los residuos almacenados o del volumen del recipiente de mayor tamaño;
- e) Contar con pasillos que permitan el tránsito de equipos mecánicos, eléctricos o manuales, así como el movimiento de grupos de seguridad y bomberos, en casos de emergencia;
- f) Contar con sistemas de extinción de incendios y equipos de seguridad para atención de emergencias, acordes con el tipo y la cantidad de los residuos peligrosos almacenados;
- g) Contar con señalamientos y letreros alusivos a la peligrosidad de los residuos peligrosos almacenados, en lugares y formas visibles;
- h) El almacenamiento debe realizarse en recipientes identificados, considerando las características de peligrosidad de los residuos, así como su incompatibilidad, previniendo fugas, derrames, emisiones, explosiones e incendios; y
- i) La altura máxima de las estibas será de tres tambores en forma vertical.

Condiciones para el almacenamiento en áreas cerradas, consistentes en:

1. No deben existir conexiones con drenajes en el piso, válvulas de drenaje, juntas de expansión, albañales o cualquier otro tipo de apertura que pudieran permitir que los líquidos fluyan fuera del área protegida;
2. Las paredes deben estar construidas con materiales no inflamables;
3. Contar con ventilación natural o forzada. En los casos de ventilación forzada, debe tener una capacidad de recepción de por lo menos seis cambios de aire por hora;
4. Estar cubiertas y protegidas de la intemperie y, en su caso, contar con ventilación suficiente para evitar acumulación de vapores peligrosos y con iluminación a prueba de explosión; y
5. No rebasar la capacidad instalada del almacén.



Condiciones para el almacenamiento en áreas abiertas, consistentes en:

1. **a)** Estar localizadas en sitios cuya altura sea, como mínimo, el resultado de aplicar un factor de seguridad de 1.5, al nivel de agua alcanzado en la mayor tormenta registrada en la zona;
2. **b)** Los pisos deben ser lisos y de material impermeable en la zona donde se guarden los residuos, y de material antiderrapante en los pasillos. Estos deben ser resistentes a los residuos peligrosos almacenados;
3. **c)** En los casos de áreas abiertas no techadas, no deberán almacenarse residuos peligrosos a granel, cuando éstos produzcan lixiviados; y
4. **d)** En los casos de áreas no techadas, los residuos peligrosos deben estar cubiertos con algún material impermeable para evitar su dispersión por viento.

Por parte de microgeneradores, consistentes en:

- I. En recipientes identificados considerando las características de peligrosidad de los residuos, así como su incompatibilidad, previniendo fugas, derrames, emisiones, explosiones e incendios;
- II. En lugares que eviten la transferencia de contaminantes al ambiente y garantice la seguridad de las personas de tal manera que se prevengan fugas o derrames que puedan contaminar el suelo.

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE EXTERNO

Los residuos serán entregados a la empresa de recolección y transporte externo, especializadas para realizar estas actividades y autorizadas por la Secretaría del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT), por la Secretaría de Comunicaciones y Transportes (SCT), así como por la autoridades universitarias correspondientes. La entrega de los residuos peligrosos por parte del generador, se acompañará por el manifiesto de recibo, transporte y recepción, mismo que será firmado por la empresa especializada como establecimiento generador de residuos peligrosos.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Ley General del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente.
2. Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
3. Reglamento de la Ley General para la Prevención y Gestión Integral de los Residuos.
4. Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Residuos Peligrosos.
5. Reglamento de la Ley general del Equilibrio Ecológico y Protección al Ambiente en Materia de Evaluación del Impacto Ambiental.

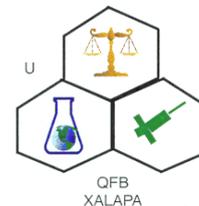


Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



6. NOM-052-SEMARNAT-2005
7. NOM-053-SEMARNAT-1993
8. NOM-087-ECOL-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental- Residuos peligrosos biológico infecciosos- clasificación y especificaciones de manejo.
9. Reglamento Federal de Seguridad, Higiene y Medio Ambiente de Trabajo
10. NOM-005-STPS-1993
11. NOM-118-STPS-2000 12. NOM-002-SCT2-1994 13. NOM-007-SCT2-1994 14. NOM-010-SCT-1994



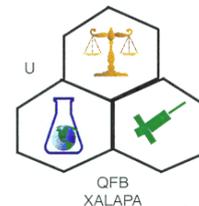
ANEXO 2.

MEDIDAS DE SEGURIDAD Y SALUD OCUPACIONAL

1. Es imprescindible y obligatorio el uso de la bata blanca, de manga larga y abotonada completamente para todo trabajo en el laboratorio.
2. El uso de equipo de seguridad especificado (guantes, googles, mascarilla) para la realización de prácticas en este laboratorio será obligatorio para estudiantes y maestros.
3. Queda estrictamente prohibido comer, beber y fumar dentro del laboratorio.
4. El uso de los equipos e instrumentos, que se utilicen durante la práctica debe reportarse en la bitácora de control y registro correspondiente.
5. Todos los equipos especialmente los aparatos delicados como microscopios, deben manejarse con cuidado evitando los golpes o el forzar sus mecanismos.
6. Todos los objetos personales deberán colocarse fuera del área de trabajo para evitar accidentes y contaminaciones.
7. Todos los estudiantes deberán mantener un comportamiento acorde con su calidad de estudiante universitario, que no ponga en riesgo la integridad física de los ahí presentes, la seguridad de las actividades que se realizan y el buen estado de materiales, reactivos, equipo e instrumentos del laboratorio.
8. Cualquier conducta inapropiada de los estudiantes dentro del laboratorio será sancionada de acuerdo con el estatuto de los alumnos vigente.
9. Antes de iniciar la práctica los estudiantes deben sanitizar su mesa de trabajo utilizando un desinfectante.
10. En caso de algún percance o accidente se debe comunicar inmediatamente al maestro.
11. No devolver nunca a los frascos de origen los sobrantes de los productos utilizados, a fin de evitar contaminaciones, asegurarse de que queden bien cerrados.
12. Todo material contaminado después de inactivarse se depositará en los recipientes biológicos infecciosos según la Norma Oficial Mexicana. (NOM 087).
13. Durante y al finalizar la práctica los estudiantes deben mantener y dejar limpia sus áreas de trabajo.
14. Los riesgos en el laboratorio de Inmunología son escasos si se respetan las consignas de seguridad. Atendiendo la NOM-007 y NOM-087.
15. Es importante considerar que el material biológico que se maneja (sangre, plasma y suero) es potencialmente infectante, por eso se recomienda someter el material a la acción germicida enérgica.
16. Las precauciones que hay que tomar para evitar cualquier clase de contaminación corresponden más bien a una disciplina general de trabajo, que a unas reglas precisas como las que se mencionan a continuación:
 - a) Usar guantes desechables de cirugía para tomar cualquier muestra.



- b) Desinfecte con alcohol la zona de venopunción.
- c) Si se tiene heridas o alguna escoriación en la piel, debe cubrirla antes de empezar su labor en el laboratorio.
- d) El sistema para toma de muestras por venopunción, por su bajo riesgo de contaminación, es el de tubos al vacío; la manipulación del espécimen es mínima.
- e) En cuanto a peligro de contaminación se refiere, se evitará tocar con las manos la ropa, cara, cabello y objetos personales.
- f) Se evitará estrechar la mano a posibles visitas, abrir grifos, abrir y cerrar puertas, tocar el teléfono y todo aquello que exija contacto manual ajeno al análisis cuando se están ejecutando fases delicadas de éste.
- g) El lavado de manos será cuidadoso y frecuente. El secado se hará con toallas desechables.
- h) Está prohibido el uso de guantes, después de procesar la muestra, sobre todo cuando se maneje el microscopio.
- i) Cada estudiante debe llevar al laboratorio un recipiente de plástico o metal para depositar temporalmente los materiales de desecho que emplearon durante el procesamiento de la muestra.
- j) No inserte nuevamente la funda de la aguja después de haber tomado muestra de sangre, **SE AUMENTA EL RIESGO DE PUNCIÓN ACCIDENTAL**; desempate la aguja del sistema de vacío o de la jeringa y colóquela dentro del recipiente destinado para objetos punzocortantes.
- k) Transporte las muestras con sumo cuidado, manteniéndolas siempre tapadas. **NUNCA DEJE LAS MUESTRAS ABIERTAS.**
- l) La ruptura de los tubos en la centrífuga, es el más frecuente de los accidentes en el laboratorio, para minimizar el riesgo de contaminación por salpicaduras se deben balancear los tubos en la centrífuga por peso y no por volumen.
- m) En caso de ruptura de material de vidrio se procede inmediatamente a recoger de forma cuidadosa, adecuadamente protegidos, a depositar los restos en cubetas con antisépticos y/o depositarlos en recipientes para punzocortantes, lavando a continuación el lugar del accidente con desinfectante.
- n) **"NUNCA PIPETEE CON LA BOCA NINGUN ESPECIMEN DE LABORATORIO"**; use micro pipetas con puntas desechables, peras succionadoras, ayudantes de pipetas o goteros de caucho.



ñ) Las muestras de sangre se desechan en el frasco rojo de RPBI.

o) Al terminar el trabajo lávese bien las manos con abundante agua y jabón, lo mismo cuando vaya a ingerir alimentos.

17. Evite contestar al teléfono, abrir puertas, neveras, congeladores u otros elementos de uso común en el laboratorio cuando esté manipulando suero, sangre u otro espécimen biológico. Planee adecuadamente su trabajo así como los reactivos y materiales que requiere durante los procedimientos analíticos.

18. Limpie adecuadamente la mesa de trabajo con solución al 3% de hipoclorito de sodio (cloralex, clorox, etc.) al empezar y al terminar su trabajo.

19. Descarte los materiales desechables tales como jeringas, puntas de micropipetas, cubetas plásticas, etc. en una solución al 3% de hipoclorito de sodio y destrúyalas por incineración. **NUNCA REUTILICE EL MATERIAL DESECHABLE QUE HA ESTADO EN CONTACTO CON FLUIDOS BIOLÓGICOS DE PACIENTES.** Elimine en solución de hipoclorito de sodio al 3% los sobrantes de suero, plasma, sangre y demás fluidos biológicos.

20. El material de laboratorio reutilizable de vidrio o plástico, se debe colocar en solución al 3% de hipoclorito de sodio mínimo por 2 horas antes de pasarlos a lavado.

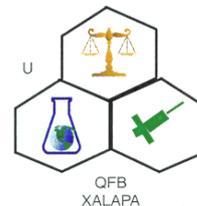
21. Las agujas desechables que se han recogido en los recipientes destinados a ello, deben destruirse por incineración. **NUNCA ARROJE AGUJAS A LA BASURA.**

22. Terminado el trabajo, hay que procurar que no quede en la mesa ningún material más que el estrictamente necesario para facilitar la limpieza y desinfección diaria.

23. Evita llevar a la boca lapiceros, rotuladores, etiquetas etc., sobre todo si han estado en contacto con la mesa de trabajo.

24. La bata se utilizará exclusivamente para el trabajo en el laboratorio. Nunca se llevará puesta para salir a la calle.

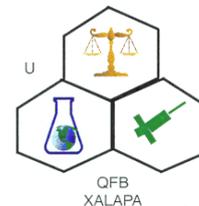
25. **RECUERDE QUE LAS NORMAS NO EVITAN UN ACCIDENTE, LO PREVIENEN. LO UNICO QUE LO EVITA ES LA RESPONSABILIDAD EN EL TRABAJO.**



ANEXO 3.

BIBLIOGRAFÍA DE LA GUIA DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

1. Aburto Almoacid, Andrés. Recomendaciones para la realización de las pruebas cruzadas en medicina transfusional. Departamento Laboratorio Biomédico Nacional y de Referencia. Instituto de Salud Pública de Chile, 2016.
2. Castro R, Prieto ES, Santo I, Azevedo J, Exposto FL. Evaluation of enzyme immunoassay technique for detection of antibodies against *Treponema pallidum*. J Clin Microbiol 2006; 41: 250-253
3. Daniel P. Stites, John Stobo, J Vivian Wells; Inmunología Básica y Clínica; El Manual Moderno, novena edición; México 2009.
4. Dvarkin, cardinali. Bases Fisiologicas de la Práctica Médica. Catoceava Edición. Editorial Médica Panamericana. 2015.
5. Hernández-Trejo M, Hernández-Prado B, Uribe-Salas F, Juárez-Figueroa L, Conde-Gonzalez CJ. Sífilis materna y congénita en dos hospitales mexicanos: evaluación de una prueba diagnóstica rápida. Rev Invest Clín 2016; 58 (pt 2): 119-125.
6. Inmunología; Libros de investigación y Ciencia, Grafesa, segunda edición, Nápoles España 2004.
7. Lopez Larrea, Reguero. Inmunología: Biología y Patología del Sistema Inmune. Cuarta Edición. Editorial Médica Panamericana. 2014.
8. Lluís Vives i Corrons, Joan; Aguilar i Bascompte, Josep Lluís. **Manual de técnicas de laboratorio de Hematología**. Primera Edición. Elsevier Masson. 2014.
9. Margni, Ricardo Aníbal. **Inmunología e Inmunoquímica**. Quinta Edición. Editorial Médica Panamericana. 2016.
10. Mejía Arregui, Malva H.; Quintanar Garcia, Elisa; Rodríguez Moyado, Héctor. **El banco de Sangre y la Medicina Transfusional**. Primera Edición. Editorial Médica Panamericana S.A. 2014.
11. Parham, Peter. **Inmunología**. Segunda Edición. Editorial Médica Panamericana. 2006.
12. Peña Cruz, José. 2014. Producción y control de calidad de vacunas. Seguridad de las vacunas: Farmacovigilancia, Santiago, Chile, OPS/OMS.
13. Rabinovich, Gabriel Adrian. Inmunopatología molecular. **Nuevas fronteras en medicina**. Primera Edición. Editorial Médica Panamericana. 2014.
14. Ricardo A Margni; Inmunología e Inmunoquímica; Editorial Panamericana; Quinta edición; Buenos Aires Argentina, 2016.
15. Romero Cabello. Vacuna y Vacunación. Fundamentos en el manejo de las inmunizaciones. Primera Edición. Editorial Médica Panamericana. 2014
16. Salinas Carmona. **La inmunología en la Salud y la Enfermedad**. Décimo novena edición. Editorial Médica Panamericana. 2014
17. Stanford T. Shulman, Md; Jonh P. Phair. MD; Herbert Somers, MD. INFECTOLOGÍA CLÍNICA. Segunda Edición. Editorial Interamericana McGraw Hill. México 2014.
18. Vega Robledo, Gloria Bertha. **Inmunología Basica y su correlación clínica**. Primera Edición. Editorial médica Panamericana. 2014.



19. Wensley Alexander, Robert A Good; Principios de Inmunología Clínica; Editorial Reverté. Biblioteca de la Fac. de Q:F:B. Xalapa RC 582, A4.
20. Fainboem, Geffner. Introducción a la Inmunología Humana. Sexta edición. Editorial Panamericana. 2014
21. Abul K. Abbas, Andrew H. Lichtman, Jordan S. Parker. **Inmunología Celular y Molecular**. Quinta edición. Editorial McGraw Hill. Interamericana. España 2014
22. William E, Paul. **Fundamental Immunology**, 6th Edition. Editorial Lippincott Williams & Wilkins. 2008.
23. Daniel P. Stites, John Stobo, J Vivian Wells; Inmunología Básica y Clínica ; El Manual Moderno, novena edición; México 2009.

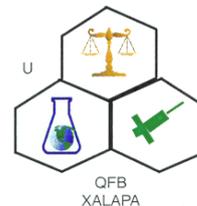
BIBLIOGRAFIA ACCESIBLE EN BIBLIOTECA DE LA FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA REGION XALAPA:

NOMBRE LIBRO	AÑO	CODIGO
Inmunología II	1981	XIQ010002801
Inmunología y serología	1982	XIQ010003512
Inmunología y serología	1982	XIQ010003678
Inmunología y serología	1982	XIQ010004567
Immunology	1996	XIQ010008984
Lo esencial de la inmunología	1975	XIQ010002783
Lo esencial de la inmunología	1975	XIQ010003560
Lo esencial de la inmunología	1975	XIQ010003645
Lo esencial de la inmunología	1975	XIQ010004430
Immunology:	1990	XIQ010009062
Inmunología /	2006	XIQ010010216
Inmunología /	2000	XIQ010009019



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



Inmunología básica y clínica	1996	XIQ010006816
Inmunología básica y clínica	1996	XIQ010006817
Inmunología médica /	2007	XIQ010012177
Inmunología médica /	2007	XIQ010012806
Inmunología básica y clínica	1998	XIQ010008196
Inmunología básica y clínica	1998	XIQ010008197
Inmunología básica y clínica	1998	XIQ010008596
Inmunología básica y clínica	1998	XIQ010008598
Inmunología básica y clínica	1998	XIQ010010200
Inmunobiología	2000	XIQ010008590
Inmunobiología	2000	XIQ010008591
Inmunobiología	2000	XIQ010009072
Inmunología	2007	XIQ010011596
Inmunobiología de Janeway /	2009	XIQ010011597
Inmunología	1997	XIQ010008217
Inmunología	1997	XIQ010008218
Inmunología	1978	XIQ010002855
Inmunología	1978	XIQ010003104
Inmunología	1985	XIQ010002581
Inmunología:	2003	XIQ010012522



Universidad Veracruzana

UNIVERSIDAD VERACRUZANA
FACULTAD DE QUÍMICA FARMACÉUTICA BIOLÓGICA
MAC María Azucena Mendoza Fernández, MC Ricardo Galán Zamora



The experimental foundations of modern immunology /	1991	XIQ010009136
Immunology:	1994	XIQ010009132