

No. 150961

Título 213 QFB

Cos. Ts 612.118220202

R 696m

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS**

**MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA**

*Que para obtener el Título:*

**QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO**

*Presenta:*

**ANGELINA RODRIGUEZ TORRES**

FACULTAD DE  
QUIMICA



BIBLOTECA

**Asesor:**

**M. en C. Leticia de la Isla Herrera**

**Querétaro, Qro.**

**Noviembre 1997**

---

*Agradezco a mis padres por su  
confianza y apoyo.  
Gracias por ser el mejor ejemplo  
a seguir.*

*A mis familiares y hermana  
por sus consejos y cariño.*

*A mis compañeros de generación  
con quienes pase inolvidables  
momentos gracias por ser ese  
excelente equipo.*

*A mis maestros, por esa capacidad  
de dar y de ayudar en los momentos  
más difíciles*

*A mis amigos, por su compañía  
en los momentos buenos y malos.*

*A todas las personas que con su paciencia,  
apoyo y consejos hicieron posible que presente  
este trabajo.*

*Quiero hacer un reconocimiento muy  
especial a mi directora de trabajo. Sin su  
paciencia, tiempo, conocimientos y muy  
especial forma de ser, hubiera sido imposible  
la realización del presente.*

*Con mucho cariño :*

*M.en C. Leticia de la Isla.*

*Quiero dedicar este trabajo con todo mi respeto  
y cariño a la M.en C Guadalupe García Alcocer  
y al M.en C Salvador Lecona Uribe. Quieres con  
sus conocimientos, consejos y apoyo. Formaron  
una parte muy importante en mi formación profesional.*

---

## INDICE

	<b>Página</b>
<b>PRESENTACIÓN</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2
<b>PARTE TEORICA</b>	
■ El anticuerpo como reactivo	5
■ Reacciones Primarias	5
■ Reacciones Secundarias	11
■ Precauciones y Método de Trabajo en el Laboratorio	22
<b>PRACTICAS BASICAS</b>	
■ Fagocitosis y Opsonización	26
■ Reaccione Febriles	29
■ Tipificación Bacteriana	33
■ Determinación de grupos sanguíneos del Sistema ABO	37
■ Subgrupos del Sistema ABO. El antígeno A1	42
■ Método inverso para determinación de grupos sanguíneos del Sistema ABO	44
■ Identificación de la propiedad secretora de los grupos sanguíneos ABO	47
■ Control de Calidad de los sueros comerciales hemoaglutinantes anti-A, anti-B, anti-AB, y lectinas anti-A1	50
■ Sistema Rh	57
■ Variable débil del antígeno D (D <sup>u</sup> )	61
■ Aidez, especificidad y título del suero hemoclasificador anti Rh	63
■ Determinación de Coombs directo y de Coombs indirecto	66
■ Determinación de la compatibilidad sanguínea. Pruebas cruzadas	70
■ Identificación de los antígenos HLA clase I por la prueba de microlinfocitotoxicidad	73
■ Proteína C reactiva	82
■ Factor Reumatoide	85
■ Determinación de hormona conadotropina coriónica humana	89
■ Electroforesis	94
■ Inmunolectroforesis	100

■ Prueba para sífilis. V.D.R.L y P.R.R.	107
■ Antiestreptocinas en suero	113
■ Determinación de anticuerpos anti HIV 1y 2 por el método de ELISA	117
■ Determinación de ANA por inumonofluorescencia indirecta	124

### **PRACTICAS COMPLEMENTARIAS**

■ Preparación de una vacuna constituida por bacterias muertas	128
■ Preparación de una autovacuna bacteriana	134
■ Determinación cuantitativa del complemento total 50% hemolítico	138

### **BIBLIOGRAFIA**

## PRESENTACIÓN

Este manual se creó tratando de proporcionar una herramienta que facilitará el trabajo del laboratorio de Inmunología y así ayudar a que el alumno comprenda más claramente tanto el principio de la técnica como el uso de la misma en el diagnóstico clínico.

Este manual se divide en tres partes:

- \* La primera que es la Parte Teórica: en la que en forma muy resumida se da un panorama general del principio en el que se basa la técnica.
- \* Prácticas Básicas: Es la recopilación de las prácticas con mayor relevancia en el laboratorio clínico en el que está implícita la Inmunología como base de la misma.
- \* Prácticas Complementarias: En esta parte se trata de conjuntar prácticas en las que se incrementa la aplicación de la Inmunología, pero ya no en el plan del laboratorio clínico en su totalidad, sino que tratamos de abarcar las aplicaciones industriales, como es la fabricación de vacunas a partir de principios inmunológicos.

Este manual se circunscribe a la infraestructura y reactivos con los que cuenta la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Querétaro, por lo tanto muchas técnicas inmunológicas quedan fuera de este trabajo.

## INTRODUCCION.

La Inmunología es una ciencia relativamente moderna, los primeros estudios que se realizaron en este campo datan de 1798 con las investigaciones realizadas por Edward Jenner. Su importancia y uso práctico han aumentado exponencialmente hasta nuestros días, en los que con el uso de ciencia y tecnología tan avanzada como microscopía electrónica, fluorescencia, radio inmunovaloraciones, biología molecular, etc. han provocado una constante innovación de técnicas específicas que se han empleado en patologías muy complejas y han ayudado a acrecentar el conocimiento de esta ciencia y su relación con las demás.

Para poder hablar de la Inmunología y su relación con las demás disciplinas tendríamos que dejar muy claro cual es su definición.

El término inmune proviene del latín *inmunis* ( libre de impuestos o de cargos ). En su empleo clásico inmunidad se refiere a la resistencia relativa del huésped para la reinfección iniciada por un agente determinado. (1)

Actualmente se sabe que las respuestas inmunitarias no siempre son beneficiosas, ni se relacionan únicamente con la resistencia a la infección. Por el contrario pueden incluso ejercer efectos como hipersensibilidad o alergia. El sistema inmunitario está destinado no solo a ejercer una función de defensa contra agentes infecciosos, sino que se ocupa también de las funciones biológicas mas diversidad de homeostasia y vigilancia. (1)

Las respuestas de inmunidad pueden clasificarse en dos categorías:

1) **INESPECÍFICAS** : Se producen después de la exposición inicial y de la subsiguiente a una configuración extraña; y aunque son selectivas para reconocer lo propio de lo extraño no dependen de un reconocimiento específico.

2) **ESPECÍFICA**. Depende de la exposición a una configuración extraña seguida de reconocimiento y de reacción contra ella.

“ Respuesta Inmunitaria Inespecifica “

El primer encuentro del huésped con una configuración extraña origina una respuesta estereotipada, consistente en movilización de elementos fagocíticos que vana parar a las zonas donde se han introducido la configuración extraña. Esto puede ocurrir como un evento aislado o como parte de la respuesta inflamatoria. (1)

**INFLAMACIÓN.**

Conjunto de acontecimientos celulares sistémicos por virtud de los cuales el huésped intenta restablecer y conservar la homeostasia ante la acción de influencias ambientales adversas. Los signos clásicos son: hinchazón, enrojecimiento, calor, dolor y función alterada. (2)

**FAGOCITOSIS.**

Es el englobamiento o destrucción de partículas extrañas al organismo por los fagocitos. Comprende un acto polifacético que requiere diferentes etapas:

- \*Reconocimiento del material que debe ser ingerido.
- \* Movilización hacia el mismo ( Quimiotaxis ).
- \*Fijación
- \*Ingestión
- \* Digestión intracelular subsiguiente por un número diverso de mecanismos antimicrobianos.

En este proceso tienen lugar una serie de reacciones bioquímicas complejas, que incluyen la utilización de factores humorales ( opsoninas ) así como de complemento. (1)

“ Respuesta Inmunitaria Específica “

Tiene a su cargo el reconocimiento y el tratamiento último al que están sometidos elementos extraños, en forma muy discriminativa. El resultado final del encuentro entre el huésped y una configuración extraña depende del volumen, estructura, naturaleza, química y cantidad de la sustancia.(2)

Cuando esta sustancia provoca una ausencia de capacidad de respuesta, se califica como tolerógeno.

Hay tres características de la respuesta inmunitaria específica y estas las distingue de la inespecífica.

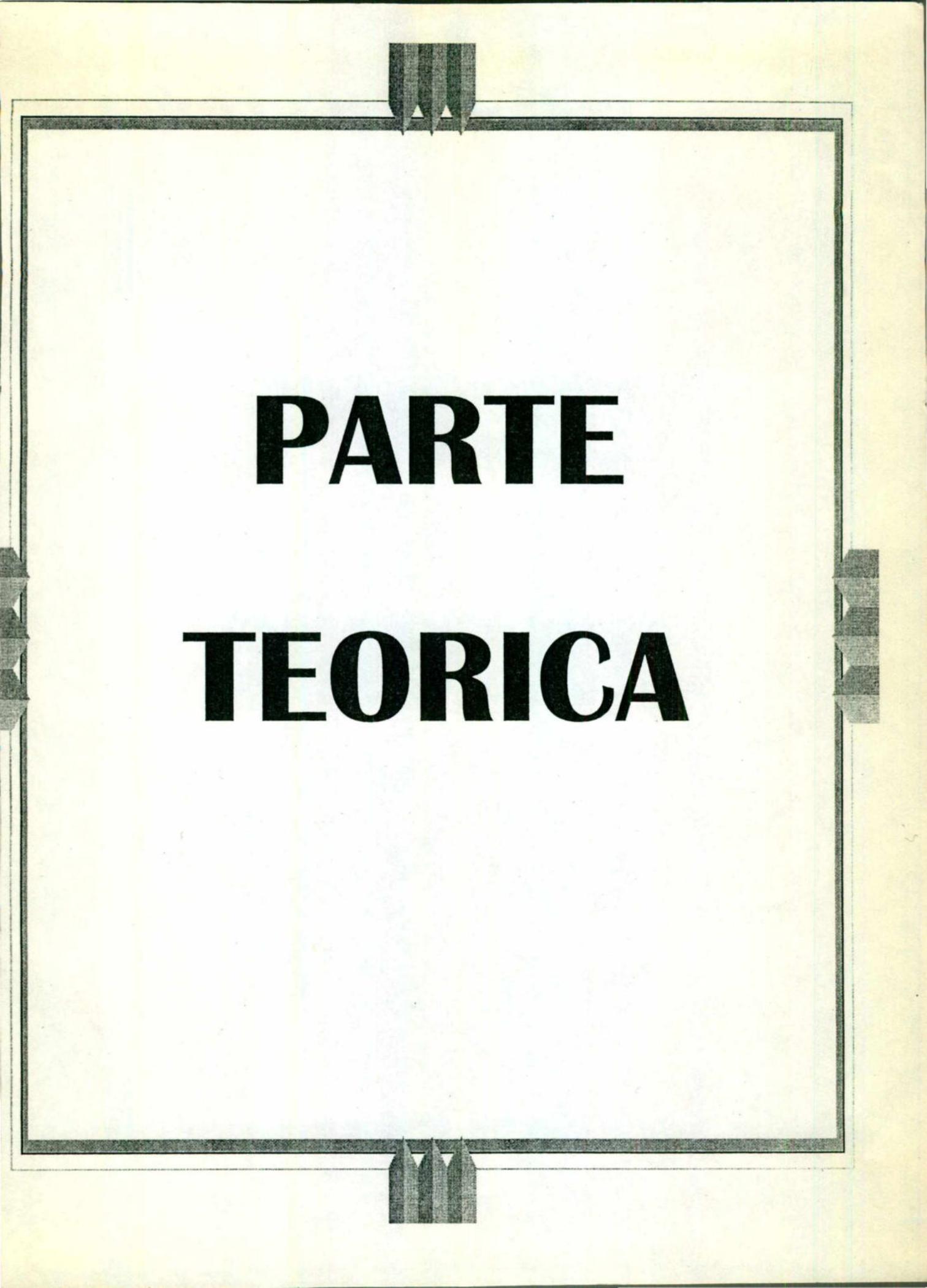
- + Especificidad.
- + Heterogenicidad
- + Memoria.

*- Respuestas inmunitarias específicas mediadas por células y humorales -*

Hay dos tipos de mecanismos efectores que median las respuestas inmunitarias específicas. Las mediadas por un producto celular de los tejidos linfoides que se denomina anticuerpo ( inmunidad humoral ) y las mediadas por los propios linfocitos sensibilizados específicamente ( inmunidad celular ). (1)

**INMUNIDAD HUMORAL.** La inmunidad humoral está mediada por un grupo de linfocitos que se diferencian en la médula ósea y se denominan linfocitos derivados de médula o linfocitos B. El anticuerpo es un producto de elementos de la célula B ( linfocitos B y células plasmáticas ); se trata de un producto ya unido a la célula o eliminado como producto extra celular. Posee la capacidad de reaccionar con la configuración que fue causa de su producción ( inmunógeno o antígeno ). En el hombre, el anticuerpo se asocia con las cinco clases principales de proteína inmunoglobulinas . (1)

**INMUNIDAD MEDIADA POR CELULAS.** Esta mediado por un grupo de linfocitos que se diferencia por influencia del timo y que en consecuencia, se denominan linfocitos que se diferencian por influencia del timo y que, en consecuencia, se denominan linfocitos T. Los productos celulares específicos, las linfocinas, incluyen factores inhibidores de migración (MIF), citotoxina, interferón y otros. (1)



**PARTE**

**TEORICA**

## EL ANTICUERPO COMO REACTIVO.

### *NATURALEZA GENERAL Y CARACTERÍSTICA DE LOS ANTICUERPOS.*

Todos los anticuerpos son globulinas constituidas por cadenas de polipéptidos de peso molecular alto y bajo, difieren de otras globulinas por su capacidad de combinarse con determinantes antigénicos de los puntos de unión del complemento.

La especificidad inmunológica del anticuerpo se refiere a su capacidad de combinarse con sustancias provistas de una sola característica fisicoquímica, la del determinante antigénico correspondiente.

Se pueden hacer algunas generalizaciones acerca de los anticuerpos:

- 1.- Se producen como respuesta a un estímulo antigénico.
- 2.- Existen cinco clases ( isotipos ) de inmunoglobulinas; IgG, IgA, IgE, IgM, IgD. Las inmunoglobulinas IgG se subdividen en cuatro subgrupos y las IgA en dos subgrupos.
- 3.- La estructura de los anticuerpos es heterogénea, de acuerdo con los correspondientes puntos antigénicos y con su función *in vivo en in vitro*.
- 4.- Todos los anticuerpos poseen la capacidad de conjugarse con su respectivos antígenos.(12)

### *TIPOS DE REACCIÓN INMUNOLÓGICA*

Las pruebas antígeno - anticuerpo pueden clasificarse según si la prueba depende de una interacción primaria entre el anticuerpo y el antígeno o bien si se basa en una manifestación secundaria, tal como una precipitación, floculación, aglutinación ó fijación de complemento.

Las manifestaciones terciarias de las reacciones antígeno - anticuerpo incluyen fagocitosis, oposonización, quimiotaxis, adherencia inmunitaria y desgranulación celular.

Así pues un conocimiento total de la interacción antígeno - anticuerpo incluye el conocimiento primero, del tipo, especificidad, afinidad y concentración de anticuerpos, luego de la concentración de antígenos y como punto final, de la actividad biológica.(12)

### REACCIONES PRIMARIAS.

La interacción *primaria* consiste en el reconocimiento específico y la combinación de un determinante antigénico con el punto de conjugación de su anticuerpo correspondiente.

Las pruebas cuantitativas que dependen por completo de la interacción primaria entre el antígeno y el anticuerpo comprenden la inmunofluorescencia, el radioinmunoensayo y pruebas inmunoenzimáticas.

Las pruebas primarias requieren lo siguiente:

- Un antígeno purificado o una preparación de anticuerpos para la reacción
- Una técnica para cuantificar el antígeno o el anticuerpo mediante el uso de un radioisótopo, enzima o marca fluorescente.
- Un método para separar el complejo reacción antígeno - anticuerpo de los antígenos o anticuerpos libres en la solución.

### *INMUNOANÁLISIS ENZIMÁTICO.*

Los nombres mas utilizados son:

EIA. Enzyme immunoassay o inmunoanálisis enzimático.

ELISA. Enzyme linked immunosorbent assay. o análisis de inmunoabsorción enzimática.

El EIA Se clasifica:

- 1.- Depende de el reactivo que hay que determinar, es decir , antígeno o anticuerpo
- 2.- Del reactivo marcado.
- 3.- La naturaleza competitiva o del análisis.
- 4.- El método de separación de los reactivos unidos o libres.

Existen varios criterios importantes para determinar la selección de un marcador enzimático en particular, entre otros; a) el número de recambios o de moléculas de sustrato que se convierten en producto por lugar enzimático / unidad de tiempo, b) pureza, c) sensibilidad, d) facilidad y velocidad de detección, e) Ausencia de factores que puedan interferir en el líquido que hay que analizar, f) grupos reactivos potenciales, g) estabilidad y h) idoneidad para un EIA homogéneo.(1)

Existen dos tipos fundamentales de EIA: el heterogéneo y el homogéneo. En el primer sistema la reacción antígeno - anticuerpo no modifica la actividad del marcador enzimático. En el segundo, la interacción antígeno - anticuerpo modula la actividad de la enzima , lo que hace que desaparezca la necesidad de un paso de separación.(1)

**EIA HETEROGÉNEO O ELISA.**

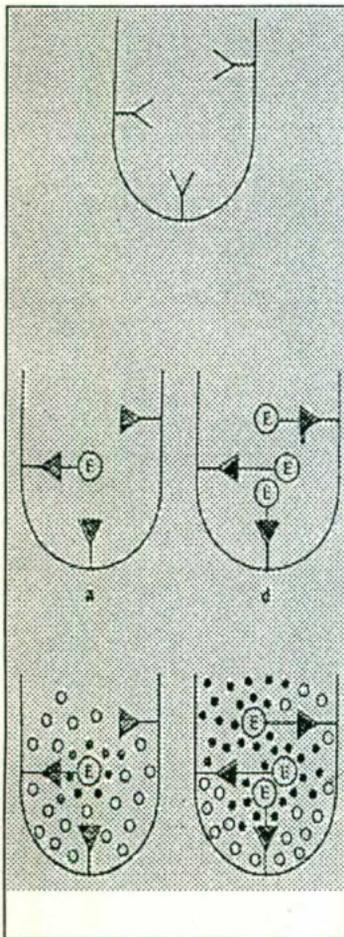
Los principios son similares a los del radioinmunoanálisis excepto en que se mide la actividad enzimática y no la radiactividad.

Los tipos de EIA heterogéneo mas frecuentes son:

- 1.- EIA competitivo para el antígeno.
- 2.- Análisis inmunoenzimométrico.
- 3.- Análisis inmunoenzimométrico de dos lugares
- 4.- Análisis en sandwich para detección de anticuerpos.
- 5.- Análisis enzimométrico doble de anticuerpos para determinación de antígenos.

**EIA COMPETITIVO PARA EL ANTIGENO.**

Este método es similar al clásico RIA con antígeno marcado. es un EIA competitivo entre un antígeno no marcado y un antígeno marcado enzimáticamente, que compite por un número limitado de puntos de unión del anticuerpo específico. La cantidad de antígeno marcado con enzima que se une al anticuerpo es inversamente proporcional a la concentración del antígeno no marcado.(1) Ver figura (1)



Inmovilizar el anticuerpo en fase sólida

Lavar

Incubar con el conjugado , antígeno unido a la enzima, junto con (a) sin (b) la muestra que contenga el antígeno

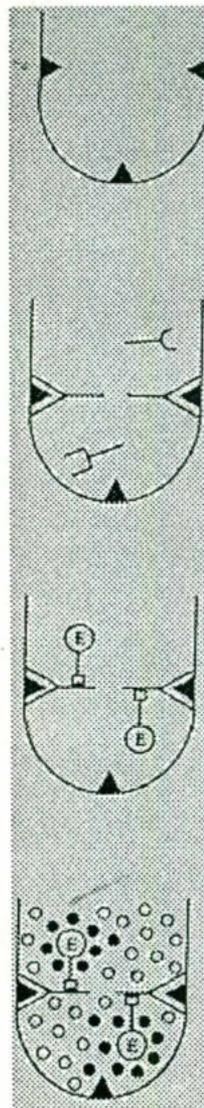
Lavar

Incubar con el sustrato enzimático y medir el producto.

Fig (1)

ANÁLISIS INMUNOENZIMÁTICO INDIRECTO.

Se comienza incubando un antígeno en fase sólida con el anticuerpo que hay que medir. Después de un lavado se añade el anticuerpo marcado enzimáticamente. La actividad enzimática que se une a la fase sólida es proporcional a la concentración existente de antígeno. (12) Ver figura (2)



Inmovilizar el antígeno al pozo de prueba

Lavar

Inmovilización del antígeno al pozo de pruebas

lavar

Incubar con la muestra que se sospecha tienen anticuerpos específicos en contra del antígeno.

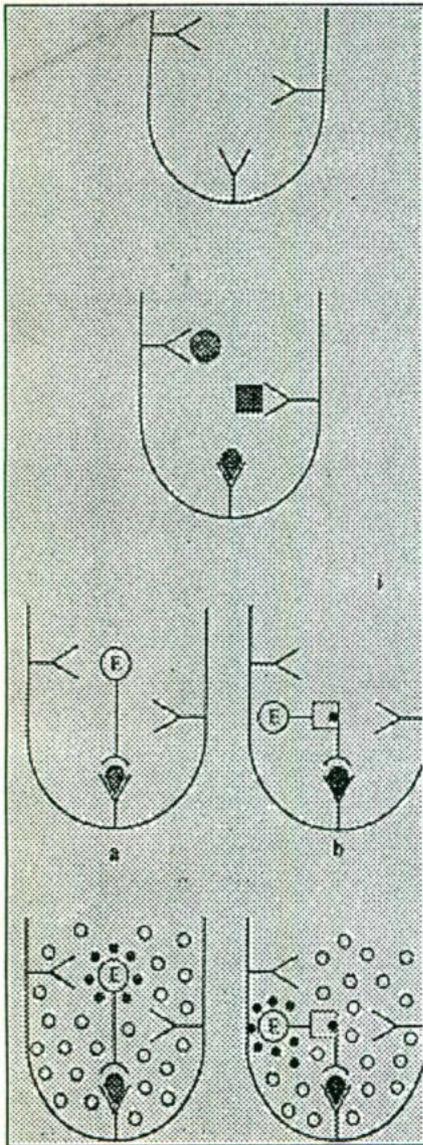
lavar

Incubar con el conjugado anti-inmunoglobulina-enzima

Fig (2)

ANÁLISIS DE SANDWICH PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS.

Se incuba el antígeno en fase sólida con una muestra que contiene el anticuerpo que hay que detectar. Cuando ha tenido lugar la reacción y después de un lavado, se añade un segundo anticuerpo, marcado enzimáticamente, que sea reactivo frente al primer anticuerpo. La cantidad de anticuerpo antígenoespecífico existente. (12) Ver figura (3)



Inmovilización del anticuerpo al pozo de prueba ( fase solida )

lavar

Incubar con la muestra que se presume contiene el antígeno

Lavar

Incubar con el conjugado (a) (anticuerpo unido a la enzima ), o bien, aumentar un paso de incubación con un anticuerpo contra el antígeno pero obtenido en una especie diferente a la del primer anticuerpo

lavar

Incubar con el sustrato enzimático y medir el producto

Fig (3)

**TECNICAS DE ANTICUERPOS INMUNOFLUORESCENTES.**

Anticuerpos marcados por fluorescencia se utilizaron para estudiar la localización de los antígenos en los tejidos. se utilizó como marcador ligado químicamente al anticuerpo específico y no altera la reactividad inmunológica. Los dos fluorocromos utilizados más ampliamente hoy en día son la fluoresceína, así como sus derivados y la rodamina o sus derivados estables.(13)

**MÉTODOS INMUNOHISTOQUÍMICOS PARA EL USO DE ANTICUERPOS FLUORESCENTES.**

Método Directo ; El anticuerpo se marca con el compuesto fluorescente y se utiliza para detectar la presencia del antígeno en el tejido fijado en un portaobjetos. Los anticuerpos marcados con fluorescencia se añaden al antígeno en su dilución óptima y se les permitir reaccionar durante unos 30 min. a temperatura ambiente o a 37°C. A continuación se lava el preparado para eliminar las gammaglobulinas marcadas que no han reaccionado con el antígeno. Los frotis hísticos son secados con glicerina diluida para su examen con el microscopio fluorescente.(12)Ver figura (4)

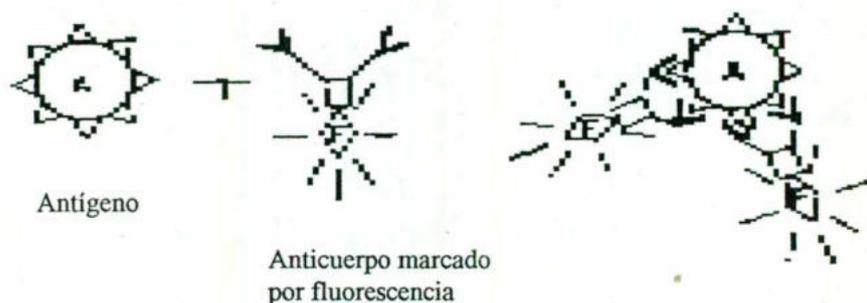
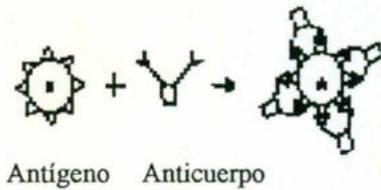


Fig (4)

Método indirecto. Se usa para la detección de antígenos desconocidos en preparados hísticos o de anticuerpos no conocidos en el suero de los pacientes. La reacción específica antígeno/ anticuerpo ( ambos sin marcar ) puede ser visualizada mediante la adición de anticuerpos marcados dirigidos contra el anticuerpo en la reacción primaria. El antígeno, globulina anticuerpo y complejo anticuerpo marcado dan por resultado la fluorescencia de antígeno recubierto.

En la detección del antígeno desconocido, o del anticuerpo los preparados histicos o el frotis se hacen reaccionar con antisuero no marcado y se les permite reaccionar durante 30 a 60 min a temperatura ambiente o a 37°C.(13) Ver figura (5)

Paso 1



Paso 2

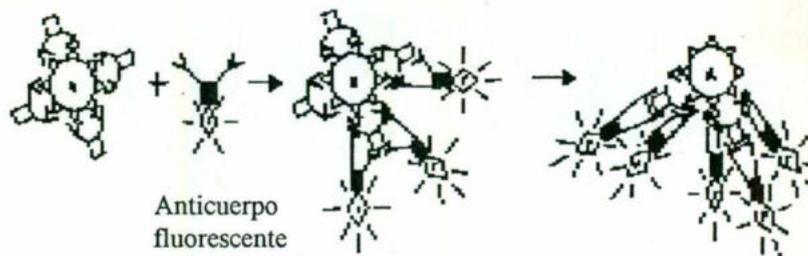


Fig (5)

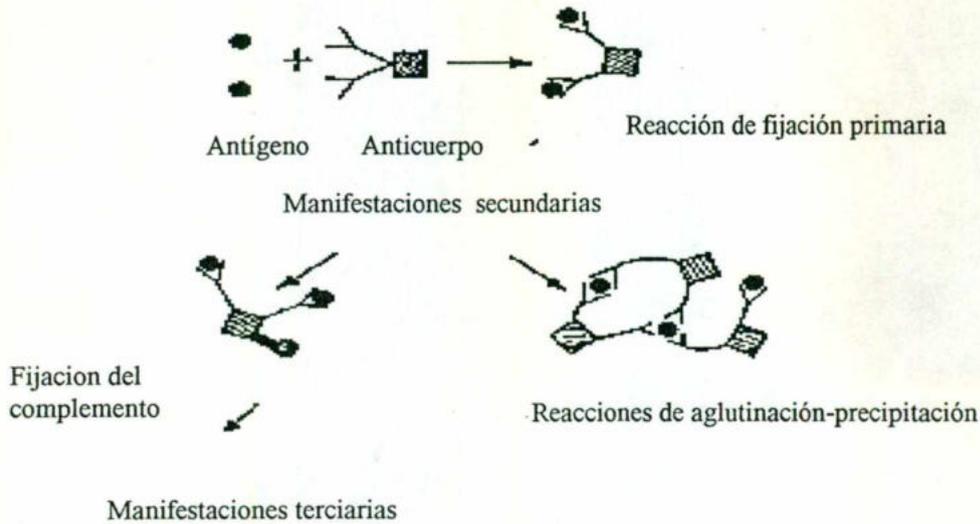
## REACCIONES SECUNDARIAS

Las manifestaciones *secundarias* de las reacciones antígeno - anticuerpo incluyen la precipitación en la solución o en el gel, aglutinación directa o aglutinación de eritrocitos y otras partículas revestidas de antígenos o anticuerpos, fijación del complemento y citotoxicidad.

### *REACCIONES DE PRECIPITACIÓN.*

La reacción de precipitación ocupa una importante posición en la inmunología y se produce cuando el suero de un animal sensibilizado es mezclado con el antígeno inmunizante. El precipitado que forma representa grandes complejos de antígeno y anticuerpo que se han combinado para formar un enrejado insoluble.(12) Ver figura (6)

REACCIONES ANTÍGENO-  
ANTICUERPO



Fig(6)

Los inconvenientes de estas técnicas son relativamente pequeños en comparación con otras más embarazosas menos directas y más complejas para el análisis macromolecular, Por el crecimiento continuo y aumento de aplicación de estas técnicas es de gran importancia la diversidad de antisueros específicos.

Otro problema de mayor entidad es la obtención de estándares estables y bien definidos.

La exactitud y sensibilidad en los análisis de inmunoprecipitación no son satisfactorias por debajo de unos valores de 1.0 a 0.5 ,mg/dl.(12)

La investigación de los factores que afectan la reacción de precipitación llevó al descubrimiento de que, además de las proporciones relativas de los reactantes, la temperatura, el pH, la concentración iónica del medio y ciertas características de los anticuerpos conocidos como avidéz y afinidad tienen importancia en la formación del preparado inmunitario. La figura 7 nos da un modelo gráfico de la formación del precipitado cuando se añaden cantidades crecientes de antígeno a una cantidad determinada de antisuero.(12)

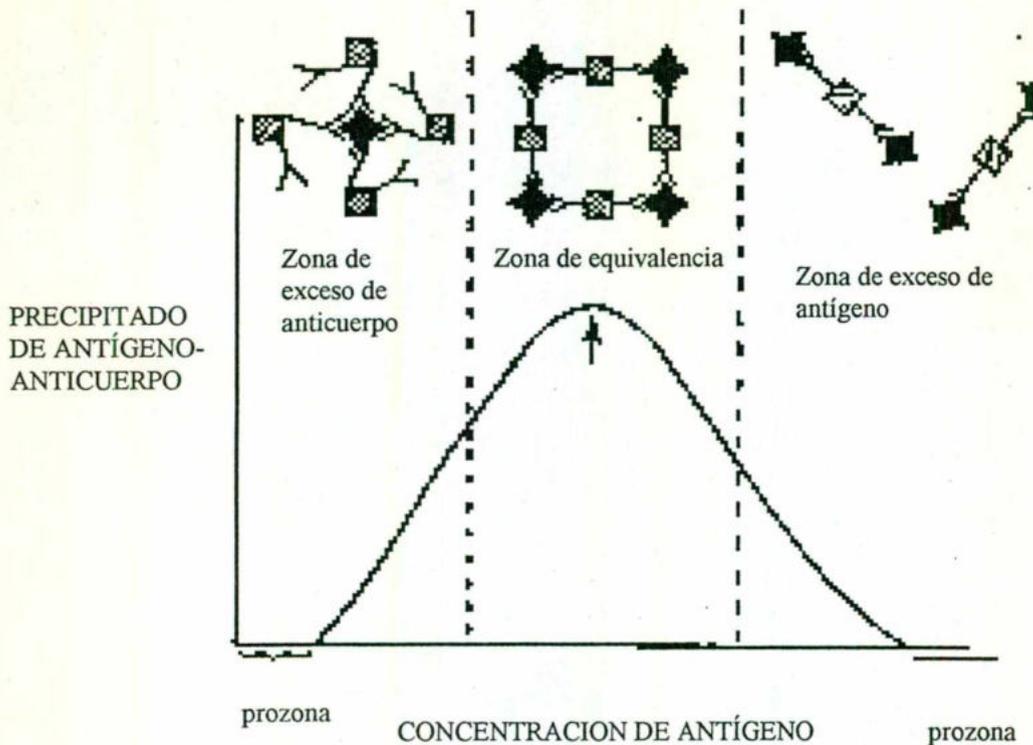


Fig (7)

Por contraste, el examen de la figura 7 muestra que al principio de la adición de antígeno existe un excedente de anticuerpos y hay, por tanto un defecto en la formación de precipitado, Esto es debido presumiblemente a la formación de complejos altamente solubles con anticuerpos abundantes, de forma que las moléculas de anticuerpos pueden superar el número de las moléculas de antígeno en la proporción de 6-7/1. Esta área de la curva del precipitado con exceso de anticuerpos en la que no hay precipitado se conoce como prozona.(12)

El punto de equivalencia, o punto de máxima precipitación tiene lugar dentro de un estrecho margen de proporción anticuerpo / antígeno. La proporción encontrada normalmente es de 3 ó 4 moléculas de anticuerpo por una de antígeno.

Tras el punto de equivalencia, de continuar añadiendo antígeno, se solubiliza el precipitado. Se cree que esto ocurre por formarse complejos de menor tamaño con el exceso de antígeno

Otra circunstancia que altera la estrecha zona de equivalencia en la curva de precipitación se produce cuando en el suero inmunológico se encuentra una mezcla de anticuerpos y estos reaccionan con los diferentes antígenos en el material inmunizante.(12)

## APLICACIONES DE LA REACCIÓN DE PRECIPITACIÓN EN EL LABORATORIO CLÍNICO.

En este tipo de reacciones sólo se detectan antígenos solubles y la inmunoglobulina involucrada es la IgG.

La adaptación de la reacción de precipitación a medios semisólidos como el gel de agar y la agarosa han simplificado grandemente las aplicaciones habituales de la técnica.

La importancia cuantitativa del grosor de la línea de precipitación formada en geles en el punto de equivalencia hace que se establezca la técnica de inmunodifusión radial simple, esta comprende la incorporación de anticuerpos en el gel de agar a una temperatura lo suficientemente baja para evitar la desnaturalización y permitir, no obstante el relleno de los recipientes adecuados.(1)

La aplicación directa del antígeno que hay que estudiar se realiza entonces como una capa en el tubo de ensayo por difusión o por un disco introducido en las placas de agar. La observación visual confirma la presencia de una línea de precipitación en el agar, Esta línea se forma en el punto de reacción óptima antígeno / anticuerpo, que es el mismo que el punto de equivalencia descrito anteriormente en la reacción de precipitación.

La distancia de la línea de precipitación del punto de aplicación del antígeno ha demostrado ser directamente proporcional a la concentración del antígeno cuando se usa una cantidad definida de antisuero en el agar.(1)

En la INMUNODIFUSIÓN DOBLE se incorpora un gel de agar como medio de soporte, el cual separa el antígeno del anticuerpo. El antígeno y el anticuerpo se aplican en puntos separados mediante cilindros perforantes en el agar o bien colocando el anticuerpo en la base del tubo de ensayo y separándolo de antígeno mediante una capa de agar. Después de un tiempo adecuado, los reactantes se pondrán en contacto en la interfase de difusión, y en el punto de equivalencia se formará la línea de precipitación. Ver figura (8)

Desconocido ( Pude ser el antígeno o el anticuerpo )

Reactante primario ( R )  
puede ser el antígeno o el anticuerpo.

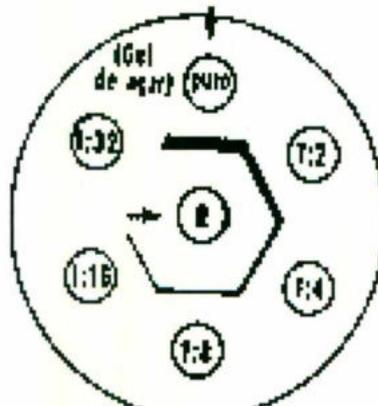


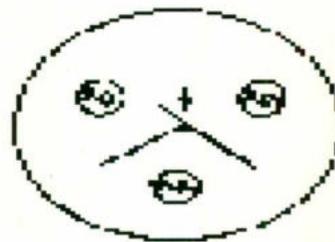
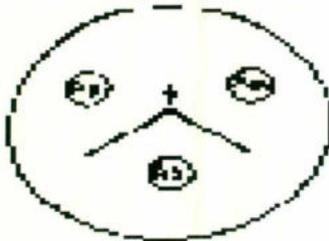
Fig (8)

Cuando la banda de precipitación se forma cerca del depósito de antígeno, es señal de que existe un exceso de anticuerpo en relación con el antígeno. Por su parte, cuando la banda de precipitación se forma cerca del depósito de anticuerpo, se indica un exceso de antígeno. En algunos casos puede o formarse banda de precipitación, en este caso seria un efecto prozonal y revela un exceso de antígeno o anticuerpo.

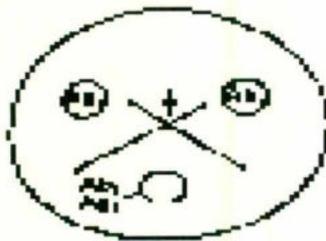
*INMUNODIFUSIÓN DOBLE EN DOS DIMENSIONES.*

Es un método descrito por Ouchterlony y que representa una variación del método de la doble inmunodifusión. Esta técnica se utiliza para comparar diferentes antígenos o distintos anticuerpos. Las moléculas que comparten una estructura antigénica idéntica muestra un dibujo de completa coalescencia de las líneas de precipitación, mientras que las que presentan diferencias antigénicas parciales muestran un dibujo en espolón. Las moléculas con diferencias antigénicas absoluta muestran un entrecruzado de las bandas de precipitación.(13) Ver figura (9)

IDENTIDAD ANTIGENICA.  
Las líneas de precipitación se fusionan en la intersección



IDENTIDAD ANTIGÉNICA PARCIAL.  
La línea de precipitación se funde completamente y muestra una huella de precipitación mas allá de la intersección. Indicativa de antígenos no compartidos.



FALTA DE IDENTIDAD ANTIGÉNICA.  
Las líneas de precipitación en la intersección. Indicativo de antígenos no compartidos.

Fig (9)

*INMUNODIFUSIÓN RADIAL (IDR), o TECNICA DE MANCINI.*

Esta técnica ofrece ventajas por su simplicidad operacional, así como por sus sensibilidad y especificidad, El enfoque representa básicamente una variación de la técnica de inmunodifusión simple en la cual se ha incorporado el anticuerpo en el agar que se vierte sobre un bandeja o placa de cristal. Entonces se cortan unos discos en el agar y en ellos se coloca el material de experimentación. Cantidades conocidas de estándares antigénicos se colocan en algunas depresiones frente a otras con material que hay que investigar desconocido.

Después de un tiempo se forman anillos de precipitación alrededor de los discos, se traza gráficamente una curva estándar midiendo los diámetros de los anillos de precipitación para los diferentes estándares de concentración.

Los diámetros de los anillos de precipitación de los desconocidos se miden a continuación y se traspasan a la curva estándar. (12) Ver figura (10)

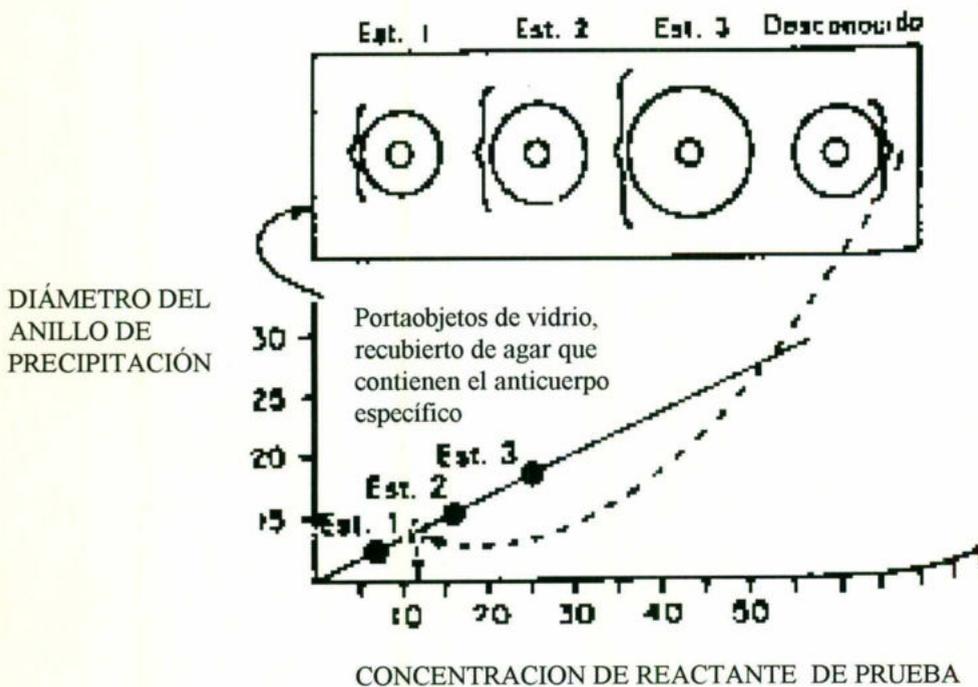
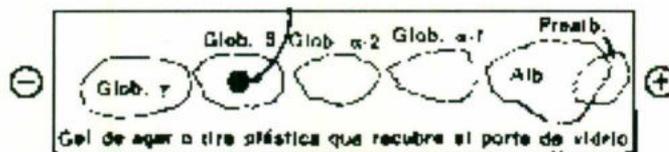


Fig (10)

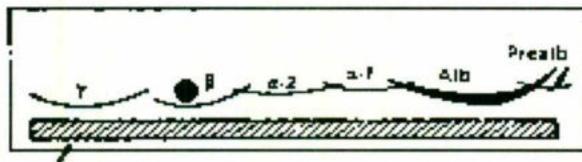
**INMUNOELECTROFORESIS.**

Aúna la separación electroforética con la reacción bidimensional de la inmunodifusión y se utiliza en la actualidad extensamente para la identificación específica y la estimación semicuantitativa de una amplia gama de antígenos. El primer paso incluye la aplicación de una muestra macromolecular, tal como el suero humano. Para llevar a cabo la inmunolectroforesis, se dispone de una depresión a lo largo del borde del portaobjetos y se aplica en él el antisuero específico. Entonces tiene lugar la difusión. En el diagrama del segundo paso en la figura se muestra un tipo representativo de líneas de precipitación que se forman con suero humano utilizando un antisuero multispecifico de las proteínas del suero humano.(12) Ver figura (11)

Depresión para la aplicación de la muestra de suero



Separación de las fracciones proteicas del suero mediante electroforesis en gel de agar.



Suero antihumano en la cubeta ( anticuerpo)

Después de la aplicación de antisuero específico en la cubeta se forman líneas de precipitación tras dos reacciones de inmunodifusión dimensionales en el agar.

Fig (11)

### ANALISIS DE LA INMUNOPRECIPITACIÓN MEDIANTE EL USO DE SISTEMAS DE DISPERSIÓN DE LUZ (TURBIDIMETRIA)..

La formación de complejos inmunes se ha relacionado con la cantidad de dispersión de la luz y utilizando como base para la cuantificación de antígenos. La técnica de la turbidimetría o espectroscopia de emisión, se basa en la absorción de la luz transmitida al fotomultiplicador. El antisuero debe poseer alta afinidad y monoespecificidad para el antígeno de prueba. Una vez determinados los porcentajes, se mezcla el antisuero con la muestra de prueba diluida, ya sea individualmente en un sistema continuo o en condiciones de mezcla continua. Desarrolladas las condiciones de estado estable, se procede a medir la absorción lumínica. La altura de los picos de respuesta del tubo fotomultiplicador se registran en una gráfica o mediante un impresor digital. Los estándares que contienen concentraciones conocidas del antígeno son registrados para obtener una curva estándar, utilizando la altura de las respuestas que son proporcionales a la concentraciones. Anotando en la gráfica las respuestas pico de la sustancia desconocida, es posible determinar la concentración por inspección directa de la gráfica de los estándares.(1)

### PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN.

La aglutinación es una reacción serológica clásica que comprende la aglomeración de una suspensión celular mediante un anticuerpo específico.

La reacción de aglutinación tiene lugar en dos etapas: la primera es en la que se conjuga el anticuerpo con el antígeno y luego se produce la aglutinación.

La prueba de aglutinación es semicuantitativa y la aglutinación de antígenos nativos insolubles o de partículas recubiertas de antígeno puede ser valorada visualmente con o sin la ayuda del microscopio. Las ventajas de la reacción de aglutinación son el alto grado de sensibilidad y la gran cantidad de antígenos que se pueden detectar mediante el uso de partículas recubiertas de antígeno o anticuerpo.

Las reacciones de aglutinación se pueden clasificar en *directas*, *indirectas ( pasivas )* y *antiglobulinas*.(12)

### PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN DIRECTA.

La prueba simple de aglutinación directa es una reacción clásica que comporta la aglomeración de células o de una suspensión de partículas insolubles, mediante anticuerpos específicos. Para demostrar anticuerpos incompletos que pueden no producir aglutinación son precisas modificaciones especiales. Por ejemplo, con anticuerpos de grupo sanguíneo Rh y anticuerpos bacilares humanos.

El tratamiento de los eritrocitos humanos con determinadas enzimas los vuelve directamente aglutinables por algunos anticuerpos incompletos como el Rh<sup>0</sup> (12) Ver figura (12)

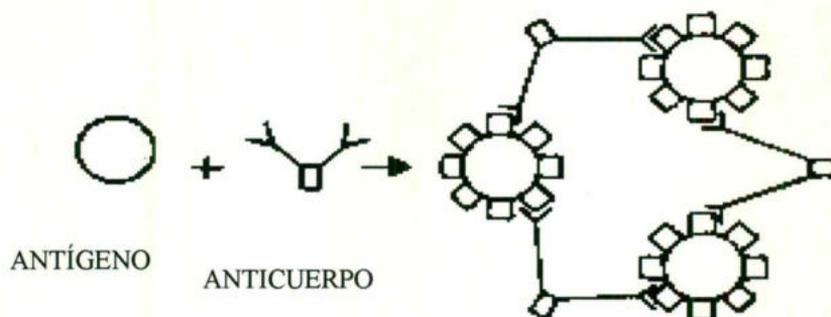


Fig (12)

#### *AGLUTINACION INDIRECTA O PASIVA.*

Esta técnica tiene aplicación múltiple en los laboratorios clínicos e implica la aglutinación de células o partículas inertes recubiertas de antígeno o anticuerpo soluble. Las células o partículas inertes son portadores pasivos y los antígenos pueden ser absorbidos físicamente o acoplados covalentemente a la superficie.

Los hematíes humanos se usan frecuentemente como transportadores aglutinables. cuando los eritrocitos se utilizan como partículas inertes, las muestras de suero deben ser primeramente adsorbidas por célula no recubiertas para eliminar anticuerpos heterófilos e inespecíficos que podrían ocasionar aglutinaciones inespecíficas.

Partículas inertes, como bentonita, látex, colodión y carbón vegetal. El látex es una suspensión de partículas esféricas de un polímero de poliestireno. Las proteínas o polisacáridos se adsorben en la superficie y facilitan que las partícula sean aglutinadas por el anticuerpo específico. Las partículas de látex con un grupo carboxílico pueden unirse por covalencia con distintos antígenos protéicos.(12) Ver figura (13)

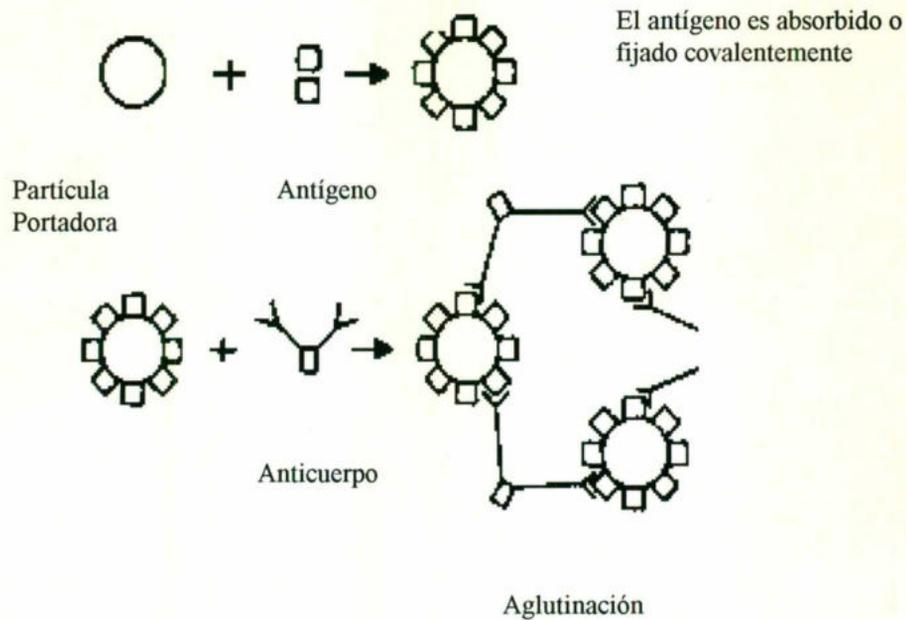


Fig (13)

**PRUEBAS DE LAS ANTIGLOBULINAS ( PRUEBA DE COOMBS ).**

Esta ingeniosa prueba fue redescubierta en 1945 por Coombs para demostrar la presencia de anticuerpos incompletos frente a los antígenos del hematíe. Los anticuerpos incompletos como IgG, anti.Rh, no producen aglutinación en una suspensión salina de eritrocitos homólogos, a pesar de combinarse firmemente con los antígenos de los eritrocitos.

Después de eliminar por lavado otras proteínas séricas, la IgG anti-Rh permanece en la superficie celular. Entonces, los eritrocitos pueden ser aglutinados mediante la adición de IgG anti-humana de conejo. La prueba de la antiglobulina es un simple método serológico para mostrar globulinas firmemente adheridas a la célula.

La *Prueba indirecta*. analiza el suero para buscar anticuerpos, permitiéndole reaccionar con las células e referencia. La *Prueba directa* detecta ya al anticuerpo en los eritrocitos del paciente.

La reacción entre el suero antiglobulina y los eritrocitos sensibilizados con el anticuerpo incompleto Rh(D) puede ser inhibida por gammaglobulina en solución. La naturaleza específica de esta inhibición se ha utilizado para determinar la especificidad de especie de la gammaglobulina en muestras no conocidas de suero, manchas de sangre, etc. (1) Ver figura (14)

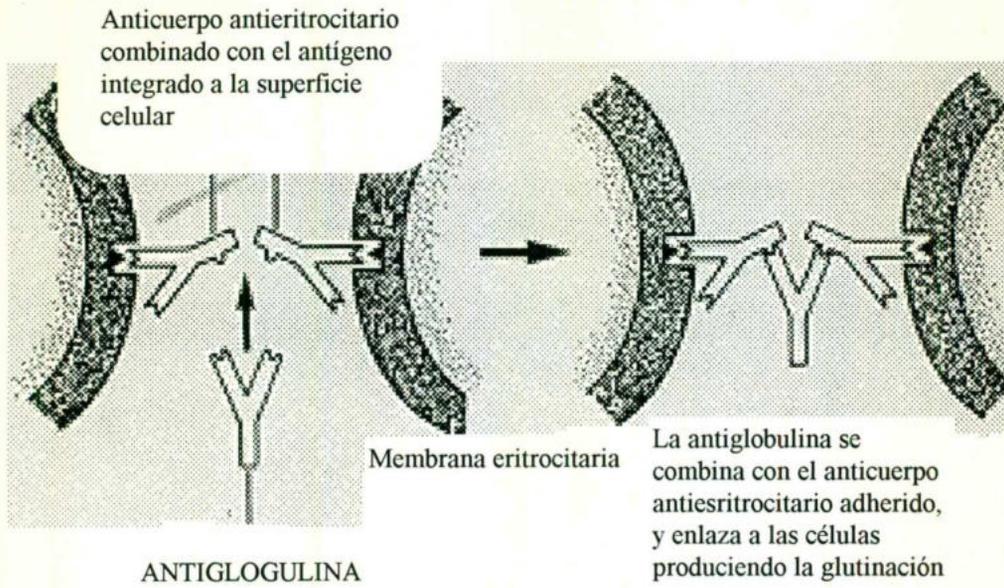


Fig (14)



**PRACTICAS**

**BASICAS**

PRECAUCIONES Y METODO DE TRABAJO EN EL LABORATORIO

Sugerencias Generales

- Lleve puesta una bata para proteger su ropa.
- Antes de entrar a trabajar al laboratorio, léase el texto de los ejercicios que va a realizar y haga el plan de trabajo con todo cuidado. Aprenda cómo hay qué hacer cada ejercicio y cuáles son los principios fundamentales que se tratan de poner en relieve.
- Cada sesión de laboratorio deberá iniciarse con una corta explicación y período de instrucciones. No empiece a trabajar hasta que haya recibido las instrucciones. Pregunte cuando no entienda el método o la finalidad de algún experimento. La buena técnica del laboratorio depende primordialmente de que se sepa lo que se va a hacer.
- Anote cuidadosamente todas sus observaciones, en el momento de hacerlas. El examen de prácticas se referirá no sólo a la información proporcionada en éste manual, sino también a sus propias observaciones y deducciones.

PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DEL TRABAJO EN EL LABORATORIO

- 1) Limpie la superficie de su mesa con una solución de germicida, al principio y al final de cada sesión de laboratorio.
- 2) Mantenga la mesa libre de todo lo que no sea esencial y al final de la sesión déjela limpia y libre de material y equipo.
- 3) El beneficio que obtenga en el laboratorio dependerá en cierta medida de su técnica, orden y limpieza.
- 4) Tome todas las precauciones posible para evitar accidente. Avise al maestro inmediatamente si sufre alguno.
- 5) Todo el material que lleve sangre o suero debe colocarse en un recipiente con cloro antes de lavarse.

## OBTENCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

### Punción Venosa.

Casi todas las muestras de sangre se obtienen por punción venosa. Es el método más fácil y adecuado para obtener un volumen de sangre suficiente para llevar a cabo gran número de pruebas. La muestra puede dividirse y tratarse conforme a las necesidades del caso; por ejemplo, parte puede mezclarse con anticoagulante para obtener plasma, sangre completo o ambos; otra parte puede dejarse coagular para obtener suero. Cuando el laboratorio tiene mucho trabajo este método es el más rápido y permite recoger rápida y permite recoger rápidamente un gran número de muestras, para preparar las diluciones exactas, con más tranquilidad en el laboratorio.

La punción suele hacerse en la vena mediana. Se localiza o se palpa fácilmente en casi todos los pacientes, y suele ser muy notable en los trabajadores manuales, sobre todo en el brazo dominante. En muchos casos en los cuales resulta difícil localizar la vena, puede hacerse resaltar diciendo al paciente que cierre y abra su mano, o mediante masaje, o por una combinación de ambos procedimientos.

Después de localizar la vena, debe verificarse que todos los tubos de ensayo y el resto de equipo se encuentren listos y estén rotulados convenientemente (nombre del paciente, número del cuarto, naturaleza de la muestra, con letra legible). La sangre puede obtenerse con una jeringa y agujas ordinarias, o un tubo al vacío con su aguja. Las ventajas del segundo son las siguientes:

- ↪ La unidad está esterilizada de antemano, y no requiere ninguna preparación.
- ↪ Existe gran variedad de tamaños de tubos, y del anticoagulante que contienen.
- ↪ Es un método más seguro para la obtención de sangre, pues las muestras pasan directamente al tubo rotulado.
- ↪ No existe peligro de que se rompan las jeringas.
- ↪ No hace falta preparar anticoagulantes ni sus recipientes, o los rótulos del caso.

Para tomar muestras de sangre de venas superficiales se deben seguir el siguiente procedimiento:

Es conveniente revisar si la aguja está afilada y su luz interior libre, si el pivote está íntegro y si el pabellón en la aguja se ajusta perfectamente a él.

Se hace una revisión de los sitios donde habitualmente se observan con facilidad venas superficiales, sobre planos resistentes y no muy sensibles: pliegue del codo mitad externa, pliegue del codo mitad interna. Si no se observan venas, conviene ligar el brazo y palpar la región del pliegue del codo, para localizar un vaso venoso.

Limpie con alcohol la piel de la zona donde va a puncionar; con la mano libre restire suavemente la piel de las regiones vecinas al sitio de la punción, para fijar la vena y establecer un plano menos móvil.

Una vez que se ha tomado la cantidad suficiente de sangre, se quita la ligadura y se retira la aguja haciendo presión con un algodón con alcohol en el sitio de la punción.

### PUNCIÓN CUTÁNEA.

Se utiliza frecuentemente la punción cutánea cuando bastan pequeñas cantidades de sangre; hemoglobina, recuento de glóbulos blancos o rojos y de plaquetas, frotis de sangre y microanálisis bioquímicos. Se utiliza cuando la punción venosa resulta difícil, por ejemplo en los niños y en caso de quemaduras extensas. En estos pacientes, pueden obtenerse muestra satisfactorias por punción cutánea utilizando un tubo de polietileno de 18 cms. De largo y 23 mm de diámetro interno. El extremo de éste tubo se prolonga con una pequeña punta de vidrio preparada por estiramiento de un tubo de vidrio de 3mm de diámetro externo.

Existen tres lugares habituales para la punción cutánea: el lóbulo de la oreja, la yema del dedo (en los niños) el talón. Cualquiera que sea el lugar escogido, debe uno cerciorarse primero de que los tejidos estén tibios, para estar seguro de que los vasos cutáneos estén dilatados y la sangre fluya libremente. De no ser así, se obtiene poca sangre, bien sea a concentración por estasis, o dilución con líquido intersticial (presión o ambas causas).

El lugar de la elección se frota con alcohol, que se deja evaporar, se realiza la punción con una pequeña lanceta estéril de metal. Se deja que las gotas de sangre salgan libremente y se aprieta lo menos posible, pues esto puede diluir la sangre con líquido intersticial.

## PREVENCIÓN DE LA HEMÓLISIS

- ⊗ La jeringa y la aguja deben estar completamente secas.
- ⊗ El secreto está en evitar la brusquedad, y se debe manejar la sangre con cuidado en todos los pasos.
- ⊗ Para sacar la sangre de la jeringa, debe retirarse primero la aguja.
- ⊗ Se evita la formación de espuma dejando escurrir la sangre lentamente sobre la pared del tubo.
- ⊗ La mezcla con el anticoagulante se consigue por inversión lenta, y no sacudiendo.
- ⊗ Para obtener sangre por punción cutánea, hay que secar bien la piel antes de picar, y deben descartarse las 2 primeras gotas.
- ⊗ Si no puede hacerse el análisis antes de 1 a 3 horas, no debe dejarse la muestra destapada a la temperatura ambiente. Se tapa y se guarda en un refrigerador entre 4 y 10°C, salvo si existen aglutininas al frío, en cuyo caso es necesario conservar la muestra en baño tibio a 37°C.
- ⊗ No deben congelarse las muestras, porque los glóbulos rojos se hemolizan durante el recalentamiento.
- ⊗ Hay que estar seguros de que todas las soluciones con las cuales se mezcla o diluye la sangre están correctamente preparadas y resultan isotónicas. Las hipotónicas producen hemólisis.

## **FAGOCITOSIS Y OPSONIZACION.**

La función de las opsoninas del suero es el reaccionar con los microorganismos y volverlos más susceptibles para su ingestión por los fagocitos. La virulencia de muchos agentes patógenos se relaciona en parte por su capacidad para evitar la fagocitosis en virtud de ciertos antígenos de superficie.

La opsonización de las bacterias puede ocurrir por cualquiera de los tres mecanismos siguientes:

- a) el anticuerpo específico por sí solo puede actuar como opsonina.
- b) El anticuerpo específico, actuando junto con el complemento a través de la vía clásica, puede promover la opsonización microbiana.
- c) La opsonización puede ser inespecífica, a través de la vía alterna del complemento.(1)

La función principal de las células fagocíticas en la economía corporal, es localizar y suprimir sustancias extrañas, como microorganismos. Para ello pueden necesitarse varias funciones integradas. En primer lugar, las células han de alcanzar la zona de configuración extraña ( quimiotaxia ). Luego, han de ingerir la sustancias extrañas ( fagocitosis). Por último, después de una serie de etapas metabólicas, la destruyen o inhiben la replicación del microorganismo ( muerte microbiana ).

La fagocitosis es el proceso por virtud del cual una partícula es ingerida por la célula. Este proceso puede dividirse en dos etapas: la fase de fijación y la fase de ingestión.

Durante la fase de fijación se establece un contacto estrecho con la partícula. Esto puede producirse entre la partícula y el fagocito directamente por procesos no estimulados. En otros casos la fijación incluyen la participación de dos tipos de receptores en la membranas plasmática del fagocito:

- 1) Receptor para el fragmento Fc de una molécula de inmunoglobulina
- 2) Un receptor para C3b, un componente del complemento.

El proceso de ingestión es la siguiente etapa de la fagocitosis que representa el aprisionamiento de la partícula. El fagocito invagina su membrana plasmática y luego la partícula es captada dentro del citoplasma y encerrada en una vacuola ( fagosoma ), cuya pared esta constituida por la membrana plasmática invertida.(1)

TÉCNICA

MATERIAL Y EQUIPO.

Tubos de ensaye de 13 X 100  
Pipetas Pasteur  
Tubos de Wintrobe  
Portaobjetos

- \* Centrífuga
- \* Microscopio
- \* Incubadora o baño maría a 37<sup>a</sup>c

REACTIVOS

Solución de bacterias ( S. aureus )  
Colorante de Wright  
Sol, Fisiológica  
Aceite de inmersión  
Sangre ( 2.5 ml con EDTA y 2.5 ml sin EDTA)

METODOLOGÍA.

Realice una toma de 5 ml de sangre, esta se divide en dos fracciones, una con EDTA y otra no. La parte con anticoagulante se distribuye entres tubos de Wintrobe, se centrifuga para separar la sangre y así obtener los glóbulos blancos que quedan entre los glóbulos rojos y el plasma. Los glóbulos blancos se extraen con cuidado con una pipeta Pasteur y se colocan en un tubo de ensaye. La parte sin anticoagulante se centrifuga también a 3000 r.p.m. para obtener el suero.

Colocar en tubos de ensaye, rotulados como 1 y 2 lo siguiente:

Tubo 1	Tubo 2
0.2 ml de suero	-----
0.2 ml de solución de bacterias	0.2 ml de solución de bacterias
0.2 ml de leucocitos	0.2 ml de leucocitos

Incubar los tubos 1 y 2 a 37°C durante 30 min. Agitando cada 10 min. Terminado el tiempo, centrifugar a 2500 r.p.m. durante 5 min. Tire el sobrenadante y la última gota de sedimento mezclarla perfectamente.

Con este sedimento hacer dos frotis para sangre de cada tubo, teñirlo por el método de Wright y observar al microscopio las células fagocitadas con objetivo de inmersión.

Determinar el índice fagocítico de cada tubo que es la cantidad de bacterias que ingiere un leucocito

Determinar el índice opsónico que es igual a la siguiente relación:

Índice fagocítico ( tubo 1 ) / Incide fagocítico normal ( tubo 2 ) = Índice opsónico

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

< 1 si la fagocitosis se realiza mejor si ayuda de opsoninas

= 1 si la fagocitosis se realiza indistintamente si hay o no opsoninas

>1 si la fagocitosis es ayudada por las opsoninas.

#### RESULTADOS

#### OBSERVACIONES

#### CONCLUSIONES.

## REACCIONES FEBRILES

Las reacciones febriles son de valor en el diagnóstico de muchas enfermedades como: fiebre, tifoidea, paratifoidea, brucelosis, tifo, y otras enfermedades causadas por rickettsias.

Estas reacciones se basan en el hecho de que cuando el organismo humano es invadido por agentes infecciosos responde produciendo anticuerpos contra ellos. In vitro estos anticuerpos se pueden identificar en el suero del enfermo por medio de los antígenos purificados correspondientes. El título de los anticuerpos depende del tipo y curso de la enfermedad.

Aglutinación bacteriana H y O. Si el antisuero corresponde a microorganismos enteros, intactos, móviles como *Salmonella typhosa*, y se emplea la misma bacteria en la prueba de aglutinación, se encuentran acúmulos grandes y ligeros, con aspecto de copo de nieve; se habla de aglutinación bacteriana de tipo H.(5)

Las bacterias móviles presentan sobre una placa de agar humedecido un desarrollo en placa delgada casi transparente. Esta variedad de aglutinación floculante, con poca adherencia, indica la intervención de antígenos flagelares ( antígenos H ) en la prueba, frente a los anticuerpos correspondientes.

El resultado es una red laxa de células agrupadas, que producen una aglutinación ligera en copo de nieve.

La variedad O de la aglutinación ( la O significa sin flagelo ). En este caso la aglutinación se debe a anticuerpos contra antígenos somáticos ( celulares ), y las paredes celulares de las bacterias establecen un contacto estrecho. Se forma una mesa de bacterias aglutinadas compacta, parecida a granizo.(1)

La aglutinación bacteriana se debe en gran parte a anticuerpos del tipo IgM.

Aplicaciones de la aglutinación. Los anticuerpos dirigidos especialmente contra los agentes causales de algunas enfermedades infecciosas aparecen en la sangre circulante pocos días después de la infección. aumentan en cantidad durante varias semanas, se mantienen relativamente constante por periodos variables de tiempo, y luego disminuyen lentamente hasta que el título es imperceptiblemente nulo.(5)

Por lo tanto la presencia de tales anticuerpos deben hacer sospechar infección por el agente etiológico específico si el paciente no ha sido infectado previamente o inmunizado condicho microorganismo. Por desgracia, en relación con el punto de vista diagnóstico, muchos individuos normalmente poseen cantidades bajas o moderadas de ciertos tipos de anticuerpos.(5)

Estos anticuerpos naturales, junto con las reacciones anamnésicas, complican la interpretación de una prueba positiva de aglutinación. En ausencia de información específica acerca de los antecedentes del paciente, se efectúan dos o más pruebas con intervalos semanales; un aumento del título de anticuerpos se considera signo de infección activa.

El descubrimiento de aglutininas en el suero de un paciente tiene valor en caso de fiebres tifoidea y paratifoideas y en muchas otras infecciones.

El diagnóstico de fiebre ondulante se facilita a veces por la prueba de aglutinación.

Los anticuerpos para *Brucella* pueden descubrirse también en el suero sanguíneo y en la leche de vacas y otros animales infectados.

la prueba de Weil-Felix para el tifus es un ejemplo de reacción heterogénica de cierto valor teórico y práctico. En 1916 Weil- Felix aislaron de la orina de un enfermo con tifus una cepa de proteus y por el suero de otros enfermos de tifus.(1)

Con bastante frecuencia se observan en el hombre aglutininas normales para *Proteus*; por lo tanto, un aumento del título en muestras segunda y terceras tomadas con intervalos de varios días se considera más importante que el valor absoluto del título para prueba aislada.

Los primeros bacteriólogos- serólogos tomaban colonias, por ejemplo de un cultivo de heces, probaban su aglutinación con suero antitífico conocido, e informaba e la presencia o ausencia de bacterias en muestras de heces que aglutinaban en suero antitífico, pero que diferían por varias propiedades bioquímicas y por e tipo de enfermedad producida. Gradualmente se establecieron una serie de tipos serológicos o variedades en el interior del grupo de gérmenes aislados frescos.(14)

La tipificación serológica es una de las etapas para la completa identificación de un organismo, y es necesario, para una terapéutica antiséptica específica. También es muy útil para estudios epidemiológicos.

El tipo serológico de un germen depende de sus componentes antigénicos distintos, o de la combinación de los mismos. El análisis antigénico completo incluye el descubrimiento de todos los componentes posibles. hasta hay, los diversos antígenos de las bacterias no han sido identificados químicamente en detalle, aunque se trata principalmente proteínas y polisacáridos.(14)

Las estructuras antigénicas de un organismo se comprueba descubriendo sus diversos componentes serológicos o determinantes antigénicos mediante antisueros adecuados adsorbidos y no adsorbidos.

### BRUCELLA

La brucelosis es una zoonosis de distribución mundial causada por bacterias gramnegativas del género brucella del que se han identificado seis especies:

- 1.- B. Abortus que infecta principalmente a bovinos
- 2.- B. Melitensis a caprinos.
- 3.- B. Suis a porcinos.
- 4.-B. Canis a caninos
- 5.- B. Ovis a ovinos.
- 6.- B. Neotomae a roedores.

Las primeras cuatro especies pueden causar enfermedad en el hombre.

De acuerdo con estudios de hibridación de ADN, se ha propuesto que el género Brucella tiene una sola especie, B Melitensis.

Los miembros del género Brucella son cocobacilos gramnegativos aerobios, inmóviles, no esporulados y parásitos intracelulares obligados.

Las diferencias bioquímicas entre las diversas especies y sus biotipos son mínimas, siendo las más importantes su capacidad para utilizar CO<sub>2</sub>, para producir H<sub>2</sub>S y para crecer en medio con tionina y fucsina básica; todas producen catalasa, ureasa y fermentan lentamente los azúcares.(15)

La virulencia de las diferentes especies de Brucella se relaciona con la actividad de la catalasa y la formación de colonias lisas e inversamente con la oxidación de ácido glutámico.(14)

#### TÉCNICA:

Material y Equipo.

2 Tubos de ensaye

1 Pipeta serológica ( 0.01 ml )

1 Pipeta Pasteur.

1 Placa de vidrio con excavaciones o porta objetos

Agitadores de madera

**REACTIVOS**

Antígenos purificados: Tífico H, Tífico O, Paratífico A, Paratífico B; Paratífico HD, OX-19.

**METODOLOGÍA.**

- 1.-Obtener una muestra de sangre sin anticoagulante y separar el suero.
- 2.- Colocar con una pipeta Pasteur una gota de suero en cada una de las seis excavaciones de la placa, adicionar una gota del antígeno a investigar ( H, O, A, B, HD, Ox-19 )
- 3.- Mezclar con un agitador diferente cada cavidad; rotar la placa por tres minutos y observar a la luz de la lampara para buscar aglutinación.

Las pruebas encontradas negativas se reportarán como tales. Las pruebas encontradas positivas deben repetirse para obtener el título de Ac, mediante el siguiente método:

- a) Colocar en las excavaciones de la placa las siguiente cantidades de suero , para cada uno de los Ags encontrados positivos: 0.08, 0.04, 0.02, 0.01, 0.005 y agregar una gota de Ag correspondiente.
- B) Mezclar con un agitador de madera, diferente para cada excavación, rotar la placa por tres minutos y observar en busca de aglutinación.

Los grados de aglutinación se clasifican en cruces: Cada positivo equivale a 25% ó una cruz de aglutinación. El criterio de positividad se determina por la menor cantidad de suero capaz de producir 50% de aglutinación es decir dos cruces de positividad.

Los títulos obtenidos par cada dilución son lo siguientes:

0.08	1:20
0.04	1:40
0.02	1:80
0.01	1:160
0.005	1:320

**RESULTADOS:**  
**OBSERVACIONES:**  
**CONCLUSIONES:**

**“TIPIFICACIÓN BACTERIANA”**  
**( Shigella, Salmonella y E. coli )**

**E. coli.**

En la actualidad se reconoce al género *Escherichia* como una sola especie en la cual hay varios cientos de tipos antigénicos. Los tipos se caracterizan por ser combinaciones diferentes de los antígenos O (antígenos lipopolisacáridos de la pared celular), K (antígenos polisacáridos capsulares), y H (proteínas flagelares antigénicas) por lo que resultan varios miles de serotipos.

La mayor parte de los casos de diarrea infantil se asocian con los serotipos O-III y 55, pero también se han involucrado a los tipos O-28, 86, 112, 119 y del 124 al 128.(15)

**Salmonelosis.**

El género *Salmonella* tiene varias especies que son patógenas del hombre y otros animales. Se diferencian de otros microorganismos entéricos y dentro de su género por reacciones bioquímicas, aspecto de las colonias en medios de cultivo diferenciales y por tipificación serológica.

Los microorganismos son bacilos gramnegativos que no forman esporas, de 0.5 y a 0.7 por 1 a 3  $\mu\text{m}$ . Se mueven por flagelos peritricos. Aunque son anaerobias facultativas, se desarrollan bien en los medios de cultivo ordinarios en presencia de oxígeno.(15)

**Shigelosis.**

El género *Shigella* de la familia *Enterobacteriaceae* recibió el nombre por Kiyoshi Shioga, quien descubrió el bacilo de la disentería en 1898. Las *Shigella* son bacilos gramnegativos inmóviles, que miden de 0.4 a 0.6 por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$ . Su desarrollo óptimo es a 37°C en condiciones de aerobiosis. No se les puede identificar por su morfología pero se las diferencia de las salmonellas por reacciones de fermentación y serológicas. Las *Shigelas* no licúan la gelatina ni producen H<sub>2</sub>S, fermentan varios carbohidratos, con la notable excepción de la lactosa, produciendo ácido sin gas.

La *Shigela* está esencialmente restringida a los humanos que son sus huéspedes naturales. Aunque pueden infectar a los primates, los humanos son sus reservorios naturales y su principal mecanismo de diseminación.(15)

### **Indicación de la prueba.**

Debido a la elevada incidencia de las enfermedades gastrointestinales en nuestro país, sobre todo en la población infantil, es necesario efectuar la identificación de los agentes etiológicos causantes de estos padecimientos.

Realizar la diferenciación en género y especie es importante desde el punto de vista terapéutico y epidemilógico, por ejemplo, en el caso de las infecciones causadas por el género *Salmonella*, el tratamiento no es el mismo si se trata de una fiebre tifoidea que de un cuadro de gastroenteritis.

Para lograr la identificación de las bacterias los microbiólogos recurren a la morfología microscópica, pruebas bioquímicas y pruebas serológicas. Estas últimas permiten, en forma rápida y sencilla llegar a la identificación final de la bacteria en cuestión.

### **Fundamento de la prueba.**

Son reacciones de aglutinación entre los antígenos de *Salmonella*, *Escherichia coli* y los respectivos antisueros específicos.

### **Contenido del equipo.**

Trabajamos con un frasco gotero con tapón de rosca con antisuero E-3: antisuero polivalente de *Escherichia coli* grupo C (Serogrupos O18:K77, O20:K61, O20:K84, O28K73 y O44:K74).

### **Material.**

- ↳ 2 tubos de ensaye
- ↳ 4 cajas petri
- ↳ Portaobjetos
- ↳ asas para inocular.

### **Técnica.**

En dos tubos de ensaye colocar caldo BHI y posteriormente hacer una suspensión de bacterias.

La suspensión de bacterias se realizará de la siguiente manera:

- ◇ En un tubo colocar E coli y en el otro Salmonella. Incubar a 37°C durante 24 horas.
  - ◇ Preparar dos placas con agar tripticasa soya y dos con MacConckey.
  - ◇ En dos placas inocular E. coli y en otras dos inocular Salmonella.
  - ◇ Preparación del antisuero.- Al frasco que contiene 1 ml de antisuero, se le agrega 2 ml de solución salina estéril, se homogeneiza evitando producir espuma y se deja reposar unos minutos.
1. Probar únicamente bacterias aisladas que han sido identificadas por morfología colonial y pruebas bioquímicas antes de realizar la prueba serológica.
  2. Resuspender una colonia en una gota de solución salina isotónica. Las colonias se muestran con aglutinación están en fase rugosa y no pueden usarse en la identificación serológica. Sólo podrán usarse para la prueba aquellas colonias que se encuentran en fase lisa.
  3. Resuspenderla colonia lisa seleccionada en una gota de solución salina isotónica sobre un portaobjetos perfectamente limpio y a continuación colocar una gota del antisuero.
  4. Mezclar perfectamente con un aplicador la gota de la suspensión de la colonia con la gota del antisuero.
  5. Agitar con un movimiento rotario por un minuto.
  6. Observar con una fuente luminosa.

#### **Interpretación de los resultados.**

Reacción positiva.- Presencia de aglutinación

Reacción negativa.- No hay aglutinación.

#### **Recomendaciones.**

1. Las reacciones de aglutinación que se observan después de un minuto, pueden deberse a la presencia de anticuerpos heterólogos o que los reactivos se hayan secado produciendo por consiguiente resultados falsos positivos.
2. Nunca deberá ponerse en contacto la suspensión bacteriana con el gotero del antisuero.

**Control de calidad.**

El uso de una cepa control es necesario para asegurar la validez de los resultados.

**RESULTADOS**  
**OBSERVACIONES**  
**CONCLUSIONES**

## **DETERMINACIÓN DE GRUPOS SANGUINEOS SISTEMA ABO.**

Landsteiner en 1900 definió los principales isoantígenos ( aloantígenos ) de glóbulos rojos humanos, pudo determinar la existencia en los glóbulos rojos humanos de dos determinantes antigénicos que llamó A y B.

Los individuos que poseían el determinante A eran grupos de sangre A; otros poseían B y eran del grupo sanguíneo B. Otros tenían glóbulos rojos que no aglutinaban con ninguno de los sueros y se llamaron C. Más tarde se comprobó que el grupo c, ahora conocido O, no expresaba un antígeno único.

Finalmente se estableció que los individuos tienen anticuerpos naturales dirigidos contra determinantes antigénicos que no existen en sus propios eritrocitos. Así pues, individuos con sangre de grupo A poseen anticuerpos anti-B y viceversa; mientras que los individuos del grupo sanguíneo O tienen anticuerpos de los dos tipos anti-A y anti-B.

Posteriormente estudiantes de Landsteiner descubrieron otro grupo que tenía antígenos A y B sin anticuerpos, y que hoy conocemos como tipo AB.

### *GRUPO GENÉTICO DE ANTÍGENOS ABO.*

La expresión en el eritrocito de los antígenos ABO está controlada por un solo gen con tres alelos A, B, O. Los alelos A y B son codominantes y son dominantes con relación al alelo O que no se expresa. Sabemos que los antígenos del grupo sanguíneo son glicoproteínas y glicolípidos, y su potencial antigénico guarda relación con las porciones carbohidrato. Hoy está aceptado que los alelos A y B codifican para enzimas que unen molécula de carbohidratos a la glicoproteína básica ( sustancia H ).

El alelo A codifica para la enzima transferasa N-acetilgalactosaminilo, que añade alfa-D-N-acetilgalactosamina, a la sustancia madre de carbohidrato, con lo cual genera el determinante antigénico A y crea las estructuras antigénicas A.

El alelo B codifica para la enzima galactosiltransferasa, que cataliza la unión de una molécula de alfa-D- galactosa a la sustancia H, con lo cual crea el antígeno B.

El alelo O, al parecer, no logra codificar por ninguna enzima, por tanto, no crea ningún antígeno único.

### *SISTEMA ABO Y SU SIGNIFICANCIA CLINICA.*

Los antígenos A, B, y H son ejemplos de sustancias cuyas expresiones antigénicas están influidas por pequeñas diferencias estructurales en residuos azucarados únicos que se hallan bajo control genético.

Estos antígenos tienen importancia evidente para las transfusiones, por cuanto la inyección de células sanguíneas que tienen antígenos A ó B a una persona con anticuerpos (aglutininas) naturales anti-A o anti-B puede originar una reacción de transfusión que ponga en peligro la vida. En tales reacciones también puede intervenir gran número de otros antígenos del grupo sanguíneo.

Esta posibilidad ha sido origen del desarrollo de una serie de pruebas llamadas de compatibilidad mayor, que analiza la presencia de anticuerpos IgM e IgG para las células donadoras en el suero del receptor.

La presencia de anticuerpos anti-A o anti-B en el suero puede provocar enfermedad hemolítica del recién nacido. En tal caso, los anticuerpos IgG maternos cruzan la placenta y se fijan a los eritrocitos fetales, provocando su hemólisis. La enfermedad hemolítica provocada pro ABO suele ser más leve que la desencadenada por incompatibilidad Rh.

Los antígenos ABO son útiles para determinaciones de paternidad, aunque suelen ser mejores las pruebas de antígenos polimórficos como los HLA. Los patólogos forenses suelen utilizar antígenos ABO para determinar el tipo de sangre que se encuentra en el lugar de un crimen, ya que estos antígenos son muy estables. Los antígenos ABO por su amplia distribución en muchos órganos y su fijación con anticuerpos naturales, se consideran importantes en el transplante de órganos.

Los antígenos de los hematíes son estructuras químicas que proporcionan propiedades específicas a su superficie y que hasta ahora sólo pueden detectarse por la reactividad de los hematíes con anticuerpos que corresponden a estos antígenos. La mayoría de éstas reacciones Ag-Ac implican la aglutinación de los hematíes, por eso los anticuerpos se suelen denominar hemaglutininas y los antígenos hemaglutinógenos.

En 1900, Landsteiner descubrió la aglutinación que se producía al mezclar los glóbulos rojos de un sujeto con los de otro, vio también que solamente se necesitaban dos antígenos para explicar los cuatro grupos sanguíneos: El primero tenía un antígeno (A), el segundo tenía el otro (B), el tercero tenía los dos (AB), y el cuarto no tenía ningún antígeno (O).

Fenotipo del grupo sanguíneo	Genotipo	Antígenos en el eritrocito	Anticuerpos en el suero	Distribución en %.
A	AA, AO	A	Anti-B	42
B	BB, BO	B	Anti-A	10
O	OO	Ni A, ni B	Tanto anti-A como anti-B	45
AB	AB	Tanto A como B	Ni anti-A ,ni anti-B	3

## **GRUPOS SANGUÍNEOS DEL HOMBRE.**

Por lo tanto en el mismo sujeto no puede coexistir el antígeno y el anticuerpo correspondiente, esto se llama "Regla de Landsteiner", la coexistencia del Ag y del Ac común ó correspondiente sería incompatible con la vida, pues la reacción serológica "in vivo" tendería a destruir los glóbulos rojos del sujeto.

Posteriormente a los descubrimientos de los grupos del sistema ABO, se han descrito numerosas variables débiles de los antígenos A y B, cuya identificación sólo puede lograrse mediante técnicas especiales.

El grupo sanguíneo de una persona es el mismo durante toda su vida pero los anticuerpos no coexisten en el momento del nacimiento sino que aparecen entre los 3 y 5 años de edad; y los anticuerpos naturales suelen provenir pasivamente de la circulación materna.

Existen en el comercio sueros tipificantes perfectamente estandarizados tanto anti-A, como anti-B y anti-AB; siempre es muy recomendable utilizar al realizar las pruebas el suero anti-AB especialmente para detectar las variantes débiles de los grupos A y B, así mismo nos sirve para identificar plenamente el grupo O. Estas pruebas pueden realizarse tanto en placa como en tubo, siendo esta última la más sensible.

Antígenos sanguíneos: son de naturaleza proteica; casi siempre forman parte integrante de la membrana del glóbulo. El antígeno de un sistema particular puede ser soluble en los líquidos corporales, llamándose entonces "sustancia del grupo sanguíneo". Muchas veces la sustancia proteínica antigénica está unida a un carbohidrato que hace las veces de hapteno. Los individuos de grupo O contienen un antígeno sustancia H que parece ser una parte ó un precursor de los antígenos A y B.

Anticuerpos sanguíneos: Normalmente se encuentran en la fracción globulínica del suero. Son producidos naturalmente y en condiciones normales actúa en solución salina a temperatura ambiente y puede reaccionar en diferentes medios, generalmente a 37 grados centígrados.

Mediante el empleo de anticuerpos adecuados, se pueden identificar antígenos en los glóbulos rojos, y los propios glóbulos constituyen el indicador de la combinación Ag-Ac. Dicha combinación Ag-Ac puede producirse de varias maneras según las condiciones de experimento o de la prueba, la misma reacción Ag-Ac puede manifestarse de diversas maneras. En general se prefiere como punto final la aglutinación.

### **MATERIAL Y REACTIVOS.**

Portaobjetos

Tubos de 13 X100

Jeringa hipodérmica estéril  
Pipetas Pasteur.  
Suero anti-A  
Suero anti-B  
Suero anti-AB  
Anticoagulante  
Solución salina isotónica

## METODOLOGÍA

### **I.- Técnica de Beth-Vicent: ( técnica en placa )**

- 1.- En un portaobjetos limpio, colocar una gota de suero anti-A, una gota de suero anti-B y una gota de suero anti-AB. Cuidando que no se mezclen entre si.
- 2.- Añadir una gota de sangre a cada gota de antisuero. Mezclar con palillos diferentes, inclinar alternadamente el portaobjetos hacia atrás y adelante.
- 3.- Observar en busca de aglutinación. No debe colocarse el portaobjetos sobre una fuente luminosa porque el calentamiento puede dispersar o debilitar la aglutinación. La temperatura no debe ser mayor que la ambiental. Las reacciones de aglutinación se producen en unos cuantos segundos, el tiempo máximo para llevar a cabo la lectura de la reacción es de tres minutos.

NOTA: Las muestras de sangre pueden tomarse de la yema de un dedo ó bien de lóbulo de la oreja, pero es más conveniente emplear sangre venosa tomada con anticoagulante para que de ésta maneja en caso de duda se puedan revisar los resultados fácilmente.

### **II. TECNICA DE SCHIFF ( técnica en tubo )**

- 1.- Obtener sangre venosa en un tubo con anticoagulante, centrifugarla, decantar el plasma y lavar los glóbulos rojos en solución salina isotónica, resuspender hasta obtener una suspensión al 2%.
- 2.- Marcar 3 tubos de ensaye 12 X 75 con las letras A, B, AB y colocar en cada uno, una gota del antisuero correspondiente.
- 3.- Adicionar a cada uno de los tres tubos una gota de la suspensión de glóbulos rojos al 2%. Mezclar perfectamente.
- 4.- Centrifugar exactamente durante 1 minuto a 1000 rpm. o bien 30 segundos a 3400 rpm.
- 5.- Agitar suavemente y observar si ha ocurrido aglutinación.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Anti- A	Anti-B	Anti-AB	Grupo sanguíneo
-	-	-	O
+	-	+	A
-	+	+	B
+	+	+	AB

De acuerdo con este cuadro se determinará el grupo a que pertenece la sangre problema, que se hará constar en el reporte. En todos los casos, pero especialmente en aquellos en que las aglutinaciones no son francas, es muy conveniente realizar la prueba sérica de confirmación.

RESULTADOS

OBSERVACIONES.

CONCLUSIONES.

## **SUBGRUPOS DEL SISTEMA ABO. EL ANTÍGENO A1.**

En 1952 G.W. Bird describió un extracto preparado de las semillas de *Dolichos biflorus*, el cual aglutinaba solamente a los eritrocitos de subgrupo A1. La lectina usada con técnicas serológicas apropiadas puede ayudar a distinguir entre los subgrupos sanguíneos A1, A1B, A2, A2B y otros subrupos débiles de A.

La lectina Anti-A1 contiene una fitohemaglutinina la cual tiene la propiedad de aglutinar a los eritrocitos que pertenecen al subgrupo A1 pero no aglutina a los subgrupos mas débiles de A.

### **TECNICA.**

#### **MATERIAL Y REACTIVOS.**

Lectina anti-A1  
Solución salina isotónica  
Tubos de ensaye 12 X 75  
Pipetas Pasteur.  
Placas de vidrio o portaobjetos  
Aplicadores.

### **METODOLOGÍA.**

#### ***Método en Tubo***

- 1.- Preparar una suspensión al 2-5% de eritrocitos a probar.
- 2.- Marcar los tubos para su correcta identificación.
- 3.- colocar dos gotas de lectina anti-A1 en los tubos membretados.
- 4.- Agregar una gota de la suspensión de eritrocitos y mezclar suavemente.
- 5.- Centrifugar 30 segundos a 1000 rpm.
- 6.- Resuspender suavemente el botón de células y examinar macroscópicamente buscando aglutinación.
- 7.- Anotar resultados.

#### ***Método en Placa.***

- 1.- Preparar una suspensión de eritrocitos al 10 % en solución salina isotónica.
- 2.- Colocar una gota de la Lectina anti-A1 sobre la placa de vidrio a temperatura ambiente.
- 3.- Adicionar una gota de la suspensión de células. Mezclar suavemente.
- 4.- Observar buscando aglutinación mientras se hacen movimientos oscilatorios con la placa por un tiempo máximo de un minuto.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Se observará aglutinación de los eritrocitos si la sangre corresponde a los subgrupos A1 o A1B.

No se observará ninguna aglutinación con los eritrocitos pertenecientes a los subrupos A2 , A2B y otros subgrupos débiles de A.

OBSERVACIONES.

RESULTADOS.

CONCLUSIONES

## METODO INVERSO PARA DETERMINACION DE GRUPOS SANGUINEOS DEL SISTEMA ABO.

El anti-A y el anti-B son producidos por individuos que carecen de los respectivos antígenos A y B. dichos anticuerpos son predominantes IgM. También pueden ser IgG, pero son menos frecuentes y generalmente son producidos por individuos del grupo O.

El anti-AB, producido por individuos pertenecientes al fenotipo o, no es una simple mezcla de anti-A y anti-B, sino que contienen un tercer anticuerpo, que presenta reacción cruzada con un antígeno presente en los hematíes A y B. Este es denominado compuesto AB o antígeno C.(2)

### *Anti-A*

El anti-A, es un anticuerpo natural de tipo IgM que produce algunos individuos A2 y A2B. El anti-A, generalmente tienen un rango térmico bajo, por cuya razón no suele tener significación clínica. Los individuos A2 cuyo suero contienen anti-A1 con un rango térmico lo bastante elevado para tener significación clínica, deben ser transfundidos con sangre de grupo O ó A2.

Los anticuerpos del sistema ABO pueden reaccionar a la temperatura corporal ( 37 grados centígrados ) y activar a complemento causando una rápida destrucción de los hematíes. El título de anti-A y de Anti-B con frecuencia está disminuido en el anciano y en los pacientes con hipogammaglobulinemias. Los niños recién nacidos no producen anti-A ni anti-B hasta que alcanzan los 3 o 6 meses de edad.(2)

<i>Fenotipos de los hematíes</i>	<i>Frecuencia porcentual</i>	<i>Anticuerpo del suero</i>
<i>A</i>	<i>43</i>	<i>anti-B</i>
<i>B</i>	<i>9</i>	<i>anti-A</i>
<i>AB</i>	<i>4</i>	<i>-</i>
<i>O</i>	<i>44</i>	<i>anti-AB</i>

Los anticuerpos presentes en el suero se hacen reaccionar con suspensiones de glóbulos rojos conocidos para obtener reacciones de hemaglutinación ( Ag-Ac), que indican que clase de Acs existen en el suero probado, y por ende que Ags poseen los glóbulos rojos correspondientes a ese suero, tomando en cuenta la regla de Landsteiner, que dice que en el mismo sujeto no pueden coexistir el antígeno y el anticuerpo correspondiente.(1)

#### TECNICA.

##### Material y Reactivos.

- Tubos de ensaye de 12 X75.
- Pipetas Pasteur
- Suspensión al 2% en solución salina isotónica de glóbulos rojos tipo A.
- Suspensión al 2% en solución salina isotónica del glóbulos rojos tipo B.

#### METODOLOGÍA.

- 1.- La prueba puede realizarse sobre suero o bien en plasma. Marcar dos tubos de ensaye 12 X 75 con A y el otro con B.
- 2.- Obtener la sangre por punción venosa, centrifugar y separar el suero, colocar una gota de cada uno de los dos tubos anteriores.
- 3.-Adicionar una gota de la correspondiente suspensión de glóbulos rojos al suero en los tubos y mezclar perfectamente. Dejar reposar las mezclas a temperatura ambiente durante un período de 5 a 15 minutos.
- 4.- Centrifugar ambos tubos durante un minuto a 1000 r.p.m. ó bien 30 segundos a 3400 r.p.m.
- 5.- remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe hemólisis ó aglutinación.

#### INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA.

<i>Eritrocitos del grupo A</i>	<i>Eritrocitos del grupo B</i>	<i>El suero proviene de sangre grupo..</i>
+	+	o
-	+	A
+	-	B
-	-	AB

*Nota* :Si se presenta hemólisis en la determinación inversa del grupo sanguíneo, una pequeña porción del suero problema deberá inactivarse mediante calentamiento a 56 grados centígrados durante 10 minutos y con éste suero calentado se repite la prueba ya sin interferencias.

OBSERVACIONES :

RESULTADOS :

CONCLUSIONES

*IDENTIFICACION DE LA PROPIEDAD SECRETORA DE LOS GRUPOS SANGUINOS ABO.*

Los antígenos A,B, y H se hallan en el plasma , en la saliva y en otros líquidos orgánicos. Su presencia en estos líquidos está controlada por el gen secretor Se, que es autosómico dominante. Las sustancias A,B y H se hallan en el plasma de todos los individuos independientemente de que sean secretores o no ;ahora bien, son mucho más abundantes en el plasma de los secretores.(3)

El 80% de los individuos caucasoides heredan el gen Se y son llamados secretores. El 20% restante no son secretores ( genotipo sese ).No se ha identificado ningún producto específico del gen Se, regula la formación de sustancias H en las secreciones y en el plasma. Así, un secretor de grupo A tienen sustancias A y H en sus líquidos orgánicos. Los no secretores (sese) no tienen sustancias ABH en sus secreciones.(2)

<i>Genes Heredados</i>	<i>H,A,Se</i>	<i>H,A,Sese ( no secretor )</i>
<i>Substancia de grupo sanguíneo en A y B las secreciones</i>		<i>Ninguna</i>

Se puede determinar si un individuo es secretor demostrando la presencia de sustancias de grupo sanguíneo ABH en su saliva. La determinación de secretores tienen escasa importancia tanto clínica como de laboratorio, pero puede ser útil en la determinación del grupo sanguíneo ABO de un individuo si el grupo de su hematíes no es concluyente.

Otras sustancias de grupo sanguíneo también se encuentran en el plasma y en la saliva, aunque su presencia en los líquidos orgánicos no está controlada por el gen Se.(2)

<i>Antígenos del grupo sanguíneo hallados en secreciones / plasma</i>	<i>Regulado por el gen Se</i>
<i>ABH</i>	<i>Si</i>
<i>Chido, Lewis, Rodgers, Sda, I</i>	<i>No</i>

Sustancias secretoras.

Los antígenos ABH son muy estables, y la localización de sustancias de grupos sanguíneos en cigarrillos, manchas de sudor se usan como evidencia en casos criminales.(2)

Esta prueba se basa en la observación de que la sustancia A,B ó H en la saliva del sujeto ( o e otros líquidos corporales ) puede neutralizar los anticuerpos naturales correspondientes. Este anticuerpo neutralizado y no puede aglutinar glóbulos rojos del mismo tipo.(3)

#### TECNICA.

##### Material y Reactivos.

- Saliva recién obtenida
- Sueros anti-A y anti-B
- Solución salina isotónica
- Vaso de precipitado
- Tubos de ensaye de 13 X 100 y de 12 X 75
- Pipetas de 1ml.
- Gradilla
- Suspensión de glóbulos rojos A y B al 5%.

#### METODOLOGIA.

1.- Se recolecta una muestra de saliva en un vaso de precipitado ( suficiente con 10 ml) inmediatamente se coloca en un tubo de ensaye y se calienta durante 10 min. En un baño de agua hirviendo. Se centrifuga unos minutos a 2500rpm para separar el coagulo que se formó al calentar. Se decanta el sobrenadante que tiene el aspecto de líquido opalescente y se coloca en el refrigerador hasta el momento de realizar la prueba.

2.- Preparar una serie de diluciones de la saliva calentada, para ello medir en cuatro tubos de ensaye de 3 mililitros de solución salina isotónica. Adicionar al primer tubo 1ml, de saliva calentada, mezclar perfectamente, tomar 1ml de la mezcla y pasarlo al segundo tubo, repetir la operación al tercero y cuarto tubo, de esta manera se tendrán las siguientes diluciones : 1 :4, 1 :16 ,1 :256 ,1 :1024.

3.- en una gradilla apropiada colocar seis tubos de ensaye en el primero colocar una gota de saliva calentada sin diluir y en los cuatro siguientes una gota de cada una de las diluciones anteriores. En el sexto tubo clocar una gota de solución salina isotónica , este tubo servirá como testigo de la aglutinación.

4.- Preparar una dilución 1 :4 del suero anti -A ó anti-B, para esto, en un tubo de ensaye medir 3 gotas del antisuero y agregar 9 gotas de s.s.i.. Mezclar perfectamente y añadir una gota de esta dilución a cada uno de los tubos que contienen salva y al testigo.

5.-Mezclar perfectamente el contenido de los tubos y dejarlos reposar a temperatura ambiente durante exactamente 10 min.

6.- Añadir una gota de la suspensión de eritrocitos del grupo A o B respectivamente, según el antisuero usado.

7.- Mezclar y dejar reposar durante 15 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 1000 r.p.m. por un minuto.

8.-Remover suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación, si es necesario al microscopio.

#### INTERPRETACION DE RESULTADOS.

La saliva de un individuo secretor contendrá la sustancia A o B. Esta sustancia neutraliza al anticuerpo correspondiente e inhibe la aglutinación de los eritrocitos que son adicionados en la segunda parte de la reacción. Se toma un punto final de la dilución más alta de la saliva que muestre inhibición total de la aglutinación de los eritrocitos. El testigo deberá mostrar aglutinación franca.

#### RESULTADOS

#### OBSERVACIONES.

#### CONCLUSIONES.

**CONTROL DE CALIDAD DE LOS ANTISUEROS COMERCIALES HEMOAGLUTINANTES  
ANTI-A, LECTINA ANTI - A1, ANTI-B, ANTI AB.**

Esta prueba esta fundamentada en la hemaglutinación directa entre el suero comercial que contiene anticuerpos monoclonales y los antígenos existentes en la superficie de los eritrocitos.

Los métodos son semicuantitativos y consisten en determinar cual es la máxima dilución del suero a analizar capaz de aglutinar el antígeno específico.

Las diluciones generalmente se hacen en razón de 2 y el título se expresa por la inversa de la máxima dilución aglutinante. Si la dilución 1/1024 aglutina y no lo hace la dilución 1 / 2048 el título será 1024. Los valores obtenidos son groseros y pueden aproximarse efectuando diluciones intermedias. No obstante ello, es una metodología de singular importancia diagnóstica, ya que, efectuada en forma seriada, la variación del título de anticuerpos puede ser muy útil para seguir la evolución de una infección bacteriana o de una isosensibilización por antígenos hemáticos.(4)

La aglutinación rápida es muy usada en serología diagnóstica. Cuando se valora un antisuero, la disminución de los anticuerpos por dilución hace que decrezca la aglutinación en los primeros tubos de la serie, en los que la concentración de anticuerpos es máxima, con aglutinación positiva en diluciones mayores. A este fenómeno se le conoce como prozona. Mediante el empleo de anticuerpos marcados y otras metodologías, se ha podido demostrar que en esos tubos, aun en ausencia de aglutinación, el anticuerpo está unido al antígeno.(11)

**AVIDEZ, ESPECIFICIDAD Y TITULO DE SUEROS HEMOCLASIFICADORES ANTI-A,  
LECTINA ANTI- A1, ANTI - B, ANTI-AB.**

→ MATERIAL BIOLÓGICO

Suspensión celular al 5% de células A, A1, B, AB, O.  
Se efectúa con solución salina isotónica al .09%

→ MATERIAL Y EQUIPO

Placas de vidrio, aplicadores de madera, cronometro, lámpara de neón, tubos de ensaye, pipetas Pasteur, gradillas, bulbos, tubos para centrifuga, pipetas de .1 ml, centrifuga serofuge, agitador.

→ REACTIVOS.

Sueros hemoclasificadores Anti A, Lectina Anti-A1, Anti B, Anti AB.  
Solución salina isotónica al .09%  
Glóbulos rojos A, A1, B y O

→ MATERIAL BIOLÓGICO

Suspensión celular al 5% de células A, A1, B, O

→ MATERIAL Y EQUIPO

Tubos, gradilla, centrifuga, pipeta Pasteur, bulbos.

→ REACTIVOS.

Lectina Anti-A1, Suero anti A, anti B, anti AB, sol, salina .9%  
Sueros hemoclasificadores anti-a, , anti-b, anti-ab. Lectina Anti-A1

→ PRUEBA DE AVIDEZ

1. Etiquetar cuidadosamente
2. Poner sobre una placa de vidrio una gota de antisuero a probar y lo más cercano posible una gota de células según le corresponda, cuidadosamente que no se juntes.

→ PASOS A SEGUIR.

Anti-A	1 gota de suero anti A, más una gota de células A-1 1 gota de suero anti A, más una gota de células A-2
Lectina Anti -A1	1 gota de Lectina Anti-A1, más una gota de células A-1
Anti B	1 gota de suero anti - B, más una gota de células B.
Anti AB	1 gota de suero anti AB más, una gota de células A-1 1 gota de suero anti AB más, una gota de células A-2 1 gota de suero anti AB más, una gota de células B 1 gota de suero anti AB más, una gota de células A2B

3. Mezclar las dos gotas con la ayuda de un palillo.
4. poner en marcha el cronómetro al iniciar la mezcla.
5. Parar el cronómetro en el momento que la reacción inicia.
6. Esperar un min. Como máximo para cada reacción.
7. Anotar el tiempo de reacción.
8. Valores de referencia:

Antisuero A	Células	Tiempo máximo de reacción.
ANTISUERO A	Células	Tiempo máximo de reacción.
ANTI A	A-1	15 Segundos
	A-2	30 Segundos
	AB	30 Segundos
LECTINA ANTI-A1	A-1	30 Segundos
ANTI B	B	15 Segundos
ANTI AB	A-1	15 Segundos
	A-2	30 Segundos
	B	15 Segundos
	AB	30 Segundos.

Las pruebas de avidéz se realizaran de rutina a los antisueros en uso diariamente antes de empezar a trabajar u a una muestra de antisuero de cada nuevo lote que llegue.

SUEROS HEMOAGLUTINANTES ANTI A, LECTINA ANTI A1, ANTI B, ANTI AB

TITULACIÓN

1. Etiquetar todos los tubos correctamente.

ANTI A:

- a. Preparar tres series de 10 tubos.
- b. Agregar .1 ml de sol, salina a cada uno de los tubos de las 3 series.
- c. Colocar .1 m. de suero anti A al primer tubo de cada serie y mezclar bien. Para realizar la dilución en serie, a los nueve tubos restantes, transferir .1 ml del primer tubo al segundo tubo y mezclar, transferir .1 ml del segundo tubo al tercer tubo y mezclar, nuevamente transferir .1 ml del tercer tubo al cuarto tubo y así sucesivamente hasta el décimo tubo, quedando una dilución de:

1. 1:2	2. 1:4	3. 1:8	4. 1:16	5. 1:32
6. 1:64	7. 1:128	8. 1:256	9. 1:512	10. 1:1024

- e. A la serie 1 agregar 1 gota de suspensión celular al 5% de células A, a cada tubo.
- f. A otra serie agregar 1 gota de suspensión celular al 5% de cel. A<sub>2</sub>, a cada tubo.
- g. A otra serie agregar cel. A1 5% AB a cada tubo.
- h. Centrifugar todos los tubos a 3,400 rpm durante 15 segs.
- i. Anotar los resultados con el sistema O a 4 cruces, leer los tubos empezando de la dilución mayor.

LECTINA ANTI-A1

La titulación de éste suero es casi igual al suero Anti A con la diferencia de que en el paso (e) se utiliza Lectina Anti-A y de igual manera se agregan células A<sub>1</sub>.

ANTI B

- a. Preparar 1 serie de 10 tubos
- b. Agregar .1 de sol, salina a cada uno
- c. Colocar .1 ml de suero anti B al primer tubo y mezclar bien
- d. Repetir los pasos descritos en el punto ( d ) del anti A
- e. Agregar 1 gota de suspensión celular al 5% de cel. B a cada tubo.

## ANTI AB

- a. Preparar cuatro series con 10 tubos cada una
- b. Agregar .1 ml de suero Anti AB al primer tubo de cada serie y mezclar
- c. Colocar .1 ml de suero Anti AB al primer tubo de cada serie y mezclar
- d. Repetir los pasos descritos en el punto (d) del anti A.
- e. Agregar a la primera serie de 10 tubos, una gota de suspensión celular al 5% de cel. A cada tubo y a la otra serie, 1 gota de suspensión celular al 5% de cel. A cada tubo, a la tercera serie agregar cel. B y a la última cel. AB

2. Centrifugar todos los tubos a 3400 rpm. Durante 15 segs. Para obtener 1 botón celular.

3. Agitar suavemente el tubo para desprender el botón celular, observe y anote las reacciones con el sistema de 0 a 4 cruces. Leer los tubos comenzando con la dilución mayor.

4. Valores de referencia

SUERO	GRUPO SANGUINEO O SUBGRUPOS	TITULO MIN. ACCEPTABLE
ANTI-A	A	1:256
	A	1:128
	A B	1:128
	A B	1:64
LECTINA ANTI-A1	A	1:64
ANTI B	B	1:256
ANTI AB	A	1:256
	B	1:256
	A	1:128
	A B	1:64

La titulación se hará a una muestra de antisuero de cada nuevo lote que llegue, reactivos caducados y a aquéllos que hayan sufrido cambios bruscos de temperatura.

**NOTA.** Se debe correr la prueba conjuntamente con antisueros de referencia.

SUEROS HEMOCLASIFICADORES ANTI - A, LECTINA ANTI-A1, ANTI B, ANTI AB.

PRUEBA DE ESPECIFICIDAD

1. Etiquetar cuidadosamente
2. Colocar sobre una placa de vidrio las gotas de los sueros y lo más cercano posible a cada una agregar las gotas de las células que a continuación se indica.

ANTI A  
 5 gotas de suero anti A  
 1 gota de células A  
 1 gota de células A  
 1 gota de células B  
 1 gota de células O  
 1 gota de células AB

LECTINA ANTI-A1  
 2 gotas de suero anti A Lectina.  
 1 gota de células A  
 1 gota de células A

ANTI B  
 4 gotas de suero anti B  
 1 gota de células A  
 1 gota de células A  
 1 gota de células B  
 1 gota de células O

ANTI AB  
 gotas de suero anti AB  
 1 gota de células A  
 1 gota de células A  
 1 gota de células B  
 1 gota de células O  
 1 gota de células AB

3. Homogeneizar las gotas de suero con cada una de las células, utilizando palillo diferentes para cada una.

4. Observar la reacción y anotar resultados

	A	A1	B	O	AB
ANTI A	+	+	-	-	+
LECTINA ANTI-A1	+	-	-	-	-
ANTI B	-	-	+	-	+
ANTI AB	+	+	+	-	+

Esta prueba de especificidad también se puede hacer en tubo, para lo cual en lugar de utilizar placa de vidrio, las gotas de los reactivos se colocan en tubos de 10X 75 mm y etiquetándolos correctamente.

Centrifugar todos los tubos a 3400 rpm. Durante 15 segs.

Observar la reacción y anotar resultados.

La prueba de especificidad se realizará diariamente a los antisueros de rutina, antes de empezar a trabajar y a una muestra de antisueros de cada nuevo lote que llegue.

### *SISTEMA R h.*

El sistema Rh es el segundo isoantígeno de glóbulos rojos que tienen importancia en medicina clínica. Se descubrió que por observación casual de dos fenómenos aparentemente independientes uno en el hombre, otro durante una investigación de laboratorio.

En 1939, Levine y Stetson estudiaron un recién nacido que sufría una grave enfermedad hemolítica, con ictericia intensa, edema generalizado y hepatoplenomegalia; crearon entonces el nombre de eritoblastosis fetal. Más tarde, la madre de este niño, al recibir sangre de su marido, mostró una reacción transfusional violenta.

Por casualidad, casi al mismo tiempo, Landsteiner y Wiener estaban inmunizando conejos con glóbulos rojos de mono Rhesus, intentando definir nuevas especificidades isoantigénicas de hombre.(1)

El factor Rh descrito por Landsteiner y Wiener en 1940, es un antígeno que existe en 85% de todos los eritrocitos humanos, y en los del mono Rhesus. Este antígeno común fue descubierto por estudios de hemaglutinación con glóbulos rojos humanos frente a sueros preparados en conejos contra eritrocitos de mono Rhesus. No se conocen anticuerpos naturales contra el antígeno Rh; esto explica el lapso de 40 años entre el descubrimiento de los sistemas ABO y Rh. Evidentemente, el nombre del antígeno se debe a las dos primeras letras de la palabra Rhesus.(13)

El sistema Rhesus está constituido por unos 40 antígenos distintos, cinco de los cuales revisten una importancia especial. Para designar los distintos antígenos del sistema Rh existen dos nomenclaturas principales que se utilizan indistintamente: la de Fisher-Race y la de Wiener.

La terminología de Fisher-Race se basa en la suposición de que se heredan de cada progenitor tres genes situados en un loci muy próximos. Los alelos más comunes que ocupan dichos loci se designan con los símbolos D y d, C y c, E y e. Cada gen (con excepción de d) codifica un antígeno específico, que puede ser detectado en la membrana de hematíes. Es posible que sea un alelo silencioso. La presencia o ausencia del antígeno D es la que determina si un individuo es Rh positivo o negativo.

La nomenclatura de Wiener se basa en la herencia de un solo gen procedente de cada progenitor. Cada gen tendría una estructura en mosaico, que comprendería un número variable de antígenos sanguíneos. Así el gen R1 codificaría factores que corresponderían a C, D y e de la nomenclatura de Fisher-Race. El gen r produciría los antígenos c y e pero no D, C ni E.(10)

El factor Rh es un aglutinógeno presente en los glóbulos rojos de la mayoría de los individuos, su importancia radica en que cuando un individuo no posee ese aglutinógeno si son inyectados glóbulos rojos que lo contienen, reacciona frente a esta sustancia para él extraña formando anticuerpos capaces de reaccionar con los glóbulos rojos que contienen este factor lisándolos y aglutinándolos, como este fenómeno ocurre tanto in vitro como in vivo puede dar como consecuencia una severa reacción postransfusional aún con desenlace fatal, así mismo puede presentarse este fenómeno en mujeres que carecen del factor Rh y que al concebir un hijo que ha heredado el factor Rh del padre reacciona frente al factor Rh del hijo formando anticuerpos que van a reaccionar con los glóbulos rojos del hijo destruyéndolos y dando lugar a un fenómeno de eritroblastosis fetal.(10)

#### *METODO EN PLACA :*

##### Material y Reactivos.

- Suero anti-Rh
- Anticoagulante
- Tubos de ensaye de 13 X 100
- Pipetas Pasteur
- Placas de vidrio o portaobjetos
- Jeringa hipodérmica
- Cajas petri de vidrio.

#### *METODOLOGÍA :*

1.- Para llevar a cabo la determinación del factor Rh es necesario contar con una suspensión de 50% de glóbulos rojos en su propio plasma, normalmente el paquete celular, del cual la mayor parte está constituido por glóbulos rojos, es aproximadamente el 40% por lo que para tener la concentración que se requiere para esta determinación la sangre se toma por punción venosa y se recibe en un tubo de ensaye con anticoagulante, a continuación se centrifuga a baja velocidad durante algunos minutos. Mediante una pipeta Pasteur se retira el plasma necesario para tener un volumen de este igual al que ocupan los eritrocitos. Se agita suavemente para suspender los eritrocitos en forma homogénea.

2.- Depositar una gota de suero anti-Rh en un portaobjetos. Colocarlo sobre una caja de observación y esperar hasta que alcance entre 40 y 50 grados centígrados, la observación también puede realizarse a temperatura ambiente.

3.- Depositar dos gotas de la suspensión de glóbulos rojos al 50% cerca de la gota de suero y mezclar perfectamente con un palillo de madera.

4.- Mezclar cuidadosamente los eritrocitos con el suero anti-Rh y dar a la gota movimiento de rotación sobre la placa.

5.- Observar si se produce aglutinación microscópica, la cual debe aparecer en 30 segundos y completarse en dos minutos después de transcurrido éste tiempo ya o debe observarse pues puede aparecer acúmulos de eritrocitos que son debidos a la desecación de la gota y de ninguna manera son debidos a una reacción de aglutinación.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Si se observa aglutinación positivas se acostumbra a reportar al presencia del factor Rh escribiendo las letras "Rh" y un signo positivo ; si hay ausencia del factor y no se observa la aglutinación se escribirán las letras "Rh" y un signo negativo. Así mismo en el lugar de los signos se pueden usar las palabras positivo o negativo según corresponda para evitar posibles confusiones.

En los casos en que la reacción sea débilmente positiva o dudosa, deberá procederse a ensayar con sueros específicos para las variantes del factor Rh para tener la completa seguridad de que se trata de un Rh negativo.

#### *METODO EN TUBO.*

##### Material y Reactivos.

- Suero Anti-Rh
  - Anticoagulantes
  - Tubos de ensaye de 13 X 100 y 12 X75
  - Jeringa y aguja estériles
- Solución salina isotónica. ( s.s.i.)

#### METODOLOGÍA

- 1.-Depositar una gota de suero anti-Rh en un tubo de ensaye de 12 X 75.
- 2.-Agregar una pequeña cantidad de sangre a tener una proporción en la mezcla de 2%. Generalmente es suficiente la cantidad de sangre que se toma con la parte gruesa de un palillo de madera.
- 3.- Mezclar perfectamente y dejar reposar durante 2 a 4 min. a una temperatura entre 20 y 37 grados centígrados.
- 4.- Centrifugar a 1000 r.p.m. durante un minuto o bien a 3400rpm durante treinta segundos.
- 5.- Adicionar 1 o 2 gotas de solución salina isotónica únicamente para facilitar la lectura , ya que aquí no importa adicionar esta s.s.i., puesto que la reacción ya se llevó a cabo pero no debe adicionarse s.s.i. en ningún otro paso de la técnica.
- 6.- Remover suavemente el sedimento y observar si ha ocurrido aglutinación microscópica.

#### INTERPRETACION DE LA PRUEBA.

Si se observa aglutinación positivas se acostumbra a reportar al presencia del factor Rh escribiendo las letras " Rh" y un signo positivo ; si hay ausencia del factor y no se observa la aglutinación se escribirán las letras " Rh" y un signo negativo. Así mismo en el lugar de los signos se pueden usar las palabras positivo o negativo según corresponda para evitar posibles confusiones.

En los casos en que la reacción sea débilmente positiva o dudosa, deberá procederse a ensayar con sueros específicos para las variantes del factor Rh para tener la completa seguridad de que se trata de un Rh negativo.

RESULTADOS:

OBSERVACIONES :

CONCLUSIONES :

### *VARIABLE DÉBIL DEL ANTÍGENO D (D<sup>u</sup>)*

Es una variante débil, poco frecuente entre los individuos caucasoides pero común entre los individuos de raza negra ( 22% ). Los hematíes D<sup>u</sup> generalmente dan reacciones débiles o negativas con el anti-D, siendo generalmente detectados gracias a la prueba indirecta de la antiglobulina ( prueba D<sup>u</sup>). Los hematíes D<sup>u</sup> pueden ser clasificados en tres categorías.(10)

- D<sup>u</sup> Adquirido.
- D<sup>u</sup> Variante
- D<sup>u</sup> Hereditario.

Variante D<sup>u</sup>. El antígeno d presenta una estructura que consta como mínimo de cuatro partes. Si faltan una o más partes del antígeno, es esto de este puede tener una expresión débil. Un individuo con la variedad D<sup>u</sup> puede producir aloanticuerpos contra la parte del antígeno d le falta. Por esta razón, los individuos que pertenecen a dicha variante deben ser transfundidos con sangre Rh negativa. Los centros de transfusión sanguínea efectúan la prueba para el factor D<sup>u</sup> a todos sus donantes Rh negativos, ya que la sangre de un D<sup>u</sup> inyectada a un receptor Rh negativo puede producir en este último una sensibilización al antígeno D.(10)

#### *DETERMINACIÓN DE LA VARIANTE D<sup>u</sup>*

##### METODOLOGÍA.

##### MATERIAL Y EQUIPO.

- + 4 tubos de ensaye de 13 X 100
- + 4 tubos de ensaye de 12 X 75
- + 1 Pipeta de 5 ml.
- + 4 Pipetas de 1 ml
- + 4 Pipetas Pasteur
- + Gradilla
- + portaobjetos
- + Centrifuga
- + Microscopio
- + Incubadora a baño maría a 37 °C

## REACTIVOS

- Sangre problema con anticoagulante
- Suero hemoclasificador anti-Rh ( anti- D )
- Solución salina al 0.9 %
- Suero de Coombs ( antiglobulina humana )

## TÉCNICA.

- a) De la sangre problema preparar una suspensión de glóbulos rojos al 5 % en solución salina isotónica.
- b) En un tubo pequeño de vidrio de 12 x 75 colocar 2 gotas de suero hemoclasificador anti-Rh ( anti-D ) y una gota de suspensión globular a 5%.
- c) Mezclar , centrifugar a 1500 rpm durante 1 min. Sacudir el tubo suavemente ( teniendo cuidado de no hacerlo con brusquedad ) buscando aglutinación macroscópica y microscópica
- d) Las mezclas ( anti-Rh suspensión de glóbulos rojos al 5 % ) que no presentan aglutinación después de incubadas a 37°C durante 45 min. Deben ser lavadas 3 veces con solución isotónica, tirar el sobrenadante del último lavado, adicionar 2 gotas de suero antiglobulina humana ( de Coombs ), mezclar y centrifugar a 1500 rpm durante 1 min. Sacudir el tubo buscando aglutinación.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Si hay aglutinación, la sangre estudiada es Rh variante D<sup>u</sup>.  
Ausencia de aglutinación, indica que la sangre es Rh negativo.

## RESULTADOS

## OBSERVACIONES.

## CONCLUSIONES

AVIDEZ, ESPECIFICIDAD Y TITULO. SUERO HEMOCLASIFICADOR ANTI Rh

MATERIAL BIOLÓGICO

Suspensión de Cel. Positivas R R o RR al 5%

Suspensión de Cel. Negativas rr al 5%

MATERIAL Y EQUIPO

Placas de vidrio, pipetas Pasteur, bulbos, aplicadores de madera, cronómetro, lámpara de luz blanca, tubos de ensaye, gradilla, centrífuga, pipeta automática de 1 ml, agitador, puntas para pipeta automática (.1 ml).

REACTIVOS

Suero anti D, albúmina bovina, sol.salina isotónica al .9%

SUERO HEMOAGRUPADOR ANTI RH ó ANTI D

Prueba de avidez en placa:

1. Etiquetar cuidadosamente
2. Poner sobre 1 placa de vidrio 1 gota de suero anti R ho y lo más cercano posible 1 gota de cel. Positivas R R o cel. R R (lo ideal son cel R ), cuidando que no se junten.
3. Mezclar las dos gotas con ayuda de 1 palillo
4. Poner en marcha el cronómetro al iniciar la mezcla
5. Parar el cronómetro en el momento de que la reacción inicie
6. Esperar dos min. Como máximo
7. Anotar el tiempo de reacción
8. Valores normales

SUERO	CÉLULAS	TIEMPO HASTA QUE PRINCIPIA LA AGLUTINACIÓN.
ANTI Rho	R R	60 segs.
	R R	60 segs.
	R r	60 segs.

**PRUEBA DE ESPECIFICIDAD EN TUBO:**

1. Etiquetar cuidadosamente
2. Colocar en dos tubos 1 gota de suero anti Rho
3. Agregar a 1 tubo 1 gota al 5% de cel. R R o R R, al otro tubo 1 gota de cel rr al 5%
4. Centrifugar los tubos a 3400 rpm durante 15 segs.
5. Leer la reacción y anotar resultados
6. Valores normales.

SUERO	CÉLULAS	AGLUTINACIÓN
ANTI Rho	R R	positiva
	R R	positiva
	rr	negativa

**TITULACIÓN**

1. Etiquetar los tubos correctamente
2. Preparar dos series de 10 tubos
3. Agregar .1 m. de albúmina a cada uno de los tubos de las dos series.

**NOTA.** Si el suero anti Rho que se va a utilizar es Nosvassera (IgG en medio salino) agregar sol. salina en lugar de albúmina.

4. Colocar 0.1 ml de suero anti Rho al primer tubo de cada serie y mezclar.
5. Para realizar la dilución en serie a los nueve tubos restantes, transferir .1 m. del primer tubo al segundo y mezclar, transferir otras .1 ml del segundo tubo al tercero, quedando 1 dilución de.

1. 1:2	2. 1:4	3. 1:8	4. 1:16	5. 1:32
6. 1:64	7. 1:128	8. 1:256	9. 1:512	10. 1:1024

6. A la primera serie de tubos agregar 1 gota de suspensión celular al 5% de cel. R R o R R a cada tubo.
7. A la segunda serie agregar 1 gota de suspensión de cel. rr
8. Centrifugar todos los tubos a 3400 rpm durante 15 segs. Para obtener un botón celular.
9. Agitar suavemente el tubo para desprender el botón celular, observe, anote las reacciones con el sist. De 0 a 4 cruces.
10. Valores normales.

SUERO	CELULAS	TITULO MÍNIMO ACEPTABLE
ANTI Rho	R R	1:64
	R R	1:32
	rr	Negativo ( para ver falsas + )

La prueba de avidez se realizará a 1 muestra de suero de cada lote que llegue y de rutina a los sueros en uso, antes de comenzar a trabajar.

La prueba de especificidad se realizará diariamente a los sueros de rutina. La titulación se hará a una muestra de suero de cada lote que llegue, a los reactivos caducados y a los que hayan sufrido cambios bruscos de temperatura.

**NOTA.** Realizar las pruebas conjuntamente con antisuero de referencia.

## **DETERMINACIÓN DE COOMBS DIRECTO Y DE COOMBS INDIRECTO.**

En la década de 1940, Coombs desarrolló un método ingenioso para descubrir los anticuerpos no aglutinantes. La prueba se basa en la antigenicidad de las moléculas de Ig las cuales, fijas sobre eritrocitos por su Fab, exponen los sitios antigénicos de sus fragmentos Fc reconocidos por sueros anti-Ig. La incubación de eritrocitos recubiertos de anticuerpos no aglutinantes con un suero anti-Ig provoca aglutinación. Esta es la prueba indirecta de Coombs. En las anemias hemolíticas también puede utilizarse la prueba directa de Coombs, que consiste en incubar eritrocitos del enfermo recubiertos in vivo por anticuerpos no aglutinantes con un suero anti-Ig. Una variante de la prueba de Coombs consiste en emplear anticuerpos anticomplemento que llegan a fijarse sobre moléculas de complemento previamente unidas a eritrocitos cubiertos de anticuerpos.(11)

El desarrollo de la técnica de la prueba de Coombs revolucionó virtualmente al campo de la inmunohematología y, en varias formas, ha encontrado una amplia aplicación en todos los campos de la inmunología. Los anticuerpos con frecuencia recubren eritrocitos pero son incapaces de formar la malla necesaria para producir aglutinación. La prueba de antiglobulina o de Coombs se utiliza principalmente para detectar cantidades subaglutinantes o no aglutinantes de anticuerpos antieritrocito. Sin embargo, también se pueden emplear reactivos de Coombs más específicos dirigidos a clases de inmunoglobulinas para detectar inmunoglobulina unidas a células.

La prueba directa de Coombs detecta la gama globulina u otras proteínas séricas que son adherentes a eritrocitos, tomadas directamente de un individuo sensibilizado, la prueba directa de Coombs es una reacción de dos etapas para la detección de anticuerpos incompletos en el suero de un paciente. las aplicaciones principales de la prueba de Coombs son : Tipificación de eritrocitos de bancos de sangre, evaluación de enfermedades hemolíticas del recién nacido, y diagnóstico de anemia hemolítica autoinunitaria.(13)

La fijación de anticuerpos de tipo IgM a los hematíes generalmente produce aglutinación. Por el contrario, los anticuerpos IgG se fijan a los hematíes, pero generalmente no producen aglutinación.

La sensibilización de hematíes por IgG puede detectarse mediante la técnica de la antiglobulina ( test de Coombs).

Hay dos tipos de pruebas de la antiglobulina: la prueba directa (DTA) y la prueba indirecta (IAT). Ambas pruebas tienen el mismo fundamento. Las dos detectan el anticuerpo o el complemento unido a la célula. La prueba directa de la antiglobulina es positiva cuando los hematíes del paciente han sido sensibilizados en su propio organismo. La prueba indirecta de la antiglobulina detecta la sensibilización *in vitro*.

En cada caso, el anticuerpo sensibilizante o el anticuerpo actúan como antígeno para el reactivo antiglobulina. La aglutinación se produce porque el anti-IgG o el anti-C3 se une al IgG o C3 humano, que a su vez está unido a hematíes colindantes, actuando así como puente.(10)

#### I) DETERMINACIÓN DE COOMBS DIRECTO.

Material y Equipo.

- 2 Tubos de ensayo d 12 X 75
- 2 Pipetas de 1 ml.
- 1 Pipeta Pasteur
- 1 Gradilla
- \* Centrifuga.

#### REACTIVOS

Sangre problema sin anticoagulante

Solución salina al 0.9%

Suero antiglobulina humana 8 de Coombs )

#### MÉTODO

- 1.- Preparar a partir de la sangre problema una suspensión de glóbulos rojos al 5% en solución salina isotónica.
- 2.- Depositar una gota de la suspensión anterior en un tubo de ensayo de 12 X 75, añadir suficiente cantidad de solución salina isotónica, centrifugar a 2500 r.p.m. durante 5 min. el sobrenadante es decantado, repetir otras dos veces el lavado con solución salina isotónica. Después del último lavado escurrir perfectamente bien los tubos, agregar 2 gotas del suero antiglobulina humana ( de Coombs ), mezclar y centrifugar a 1500 r.p.m. durante un minuto. Observar el fondo del tubo macroscópicamente en busca de aglutinación.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

No aglutinación : Negativo

Aglutinación: Positivo.

## II) DETERMINACIÓN DE COOMBS INDIRECTO

### MATERIAL Y EQUIPO

- Tubos de ensaye de 13 X 100 y de 12 X 75
- Pipeta de 5 ml.
- Pipetas de 1 ml.
- Pipeta de 0.2 ml.
- Pipeta Pasteur
- Gradilla
- \* Incubadora o Baño María a 37ª Centígrados
- \* Centrífuga.

### REACTIVOS

- Suero problema
- Sangre tipo "O" Rh positivo
- Solución salina al 0.9%
- Suero hemoclasificador anti-Rh ( Anti-D )
- Suero antiglobulina humana ( de Coombs )

### MÉTODO

Cuantitativo.

- 1.- Preparar una suspensión de glóbulos rojos " o " Rh positivo a 5% con solución salina isotónica ( previamente lavados 3 veces con solución salina isotónica ).
- 2.- Hacer diluciones seriadas al doble de suero problema en solución salina isotónica, de la siguiente manera: rotular 10 tubos de ensaye de 12 X 75 con los números; 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, y 512 colocar 0.1 ml de solución salina isotónica a cada uno de los tubos de 2 al 10 úsese una pipeta de 1 ml, graduada en décimas de ml ), poner 0.1ml de suero problema al tubo 1 y a tubo 2 ( mediante una pipeta de 0.2ml, graduada en centésimas de ml), mezclar perfectamente el contenido del tubo 2 y transferir 0.1 ml al tubo 3, mezclar y transferir 0.1 ml al tubo 4, seguir así hasta e tubo 10 y desechar 0.1ml de este último tubo. Las diluciones efectuadas son las siguientes : 1/1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256, 1/512.
- 3.- Montar el control positivo: poner en un tubo de 12X 75: 2 gotas de suero hemoclasificador anti-Rh 8 anti-D).
- 4.- Montar el control negativo: poner en un tubo de 12 X 75: 2 gotas de solución salina isotónica.
- 5.- Añadir una gota a cada tubo ( a los 10 de las diluciones del suero problema y a dos controles ) de suspensión de glóbulos rojos " O " Rh positivo a 15%. Agitar los tubos para que la mezcla sea uniforme.

6.- Incubar a 37°C durante 30 min.

7.- Centrifugar los tubos a 1500 r.p.m. durante 1min. observar el fondo de los tubos en busca de aglutinación macroscópica , empezando a partir el último tubo ( mayor dilución) y terminando en el primero ( para evitar el reporte de falsos negativos, pues en los primeros tubos puede existir una reacción prozonal: exceso de anticuerpos, que inhiben la aglutinación)

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

A) Control positivo: Aglutinación.

B) Control negativo: No aglutinación

C) Problema:

Si hay aglutinación, reportar: Anticuerpos salinos anti-Rh ( IgM) positivos a X dilución ( X ( mayor dilución que todavía presenta aglutinación ).

Si la aglutinación es negativa del tubo 1 al tubo 10, entonces es necesario:

Lavar el contenido de cada tubo y de los controles 3 veces en solución salina isotónica.

Escurrir perfectamente bien los tubos después del último lavado, agregar 2 gotas de suero antiglobulina humana ( de Coombs ) a cada tubo, mezclar y centrifugar a 1500 r.p.m. durante 1 min. Observar e fondo de los tubos, en busca de aglutinación macroscópica, empezando por el último tubo.

OBSERVACIONES.

RESULTADOS.

CONCLUSIONES.

*DETERMINACIÓN DE LA COMPATIBILIDAD SANGUINA  
PRUEBAS CRUZADAS.*

Las reacciones hemolíticas pueden ser inmediatas o de comienzo tardío. Las inmediatas dependen de la presencia de anticuerpos preformados y pueden ocurrir como resultado de dos situaciones: incompatibilidad mayor y menor. La característica distintiva entre estos dos tipos de reacciones es el origen del anticuerpo.

Las reacciones transfusionales mas graves se observan cuando hay anticuerpos en el plasma del receptor ( incompatibilidad mayor ). Si el anticuerpo está en el plasma del donador, se diluye al penetrar en la circulación del receptor y es menos probable que ocurra una reacción grave ( incompatibilidad menor ). En contraste, en el tipo tardío esta reacción de transfusión comienza tarde y solo se presenta después que se ha provocado el anticuerpo, generalmente por una respuesta activa secundaria.(1)

La prevención de una respuesta de transfusión hemolítica empieza efectuando las pruebas adecuadas de compatibilidad ( compatibilidad cruzada ). Estas pruebas demuestran la presencia de anticuerpos dirigidos contra antígenos de glóbulos rojos del donador o del receptor.

Los anticuerpos de grupos sanguíneos tiene un amplio espectro de actividad serológica, que depende de sus propiedades inmunoquímicas. Por tanto, estas pruebas se llevan a cabo en situaciones muy diversas; pro lo general consisten en pruebas a temperatura de la habitación en solución salina para descubrir ante todo anticuerpos IgM, pruebas a 37°C en solución de albúmina o solución iónica débil ( LISS) para descubrir algunos anticuerpos IgG, y la técnica de antiglobulina ( de Coombs ) para descubrir otros anticuerpos IgG dirigidos contra receptores situados profundamente en los eritrocitos.(1)

El tratamiento inmediato de la reacción de transfusión requiere interrumpirla de inmediato al primer signo sospechoso, conservando una línea intravenosa por administración directa de medicamentos si es necesario. Después que se le ha interrumpido la inyección de sangre, se elimina la hemoglobina plasmática, potencialmente tóxica para el riñón, mediante diuréticos osmóticos y líquidos en gran cantidad. Si no se produce diéresis hay que pensar en una posible insuficiencia renal aguda secundaria a necrosis tubular, y establece un programa de restricción adecuada de líquidos. Deben evitarse medicamentos vasopresores que pueden disminuir el riesgo renal y el aclaramiento de hemoglobina.(11)

Las pruebas cruzadas son reacciones Ag-Ac de hematoaglutinación; existen dos tipos de pruebas cruzadas que de acuerdo con su importancia han ido designada como Mayor y Menor. En la prueba mayor se hace reaccionar el suero del receptor ( Acs ) con los eritrocitos del donador ( Ags ), y en la prueba menor se hace reaccionar el suero del donador con los eritrocitos del receptor. Cundo las sangres del donador y del receptor son compatibles, ambas pruebas dan resultado negativo, esto se refiere a que no se presenta ningún tipo de aglutinación, esto sucede cuando ambos pertenecen al mismo grupo sanguíneo.(1)

#### TÉCNICA.

##### Material y Equipo

2 Tubos de ensaye de 13 X 100

6 Tubos de ensaye de 12 X 75

1 Pipeta de 5.0 ml

2 Pipetas de 1.0 ml

4 Pipetas Pasteur.

\* Centrífuga

##### Reactivos.

Sangre del donador con anticoagulante

Sangre del receptor sin anticoagulante

Albúmina bovina al 22%

Suero antiglobulina humano

#### METODOLOGÍA.

1.- Obtener sangre del donador y del receptor sin anticoagulante.

2.- De cada uno ( donador y receptor ) separar el suero y preparar una suspensión a 5 % de sus glóbulos rojos en solución isotónica ( previamente lavados tres veces con S.S.I. )

3.- PRUEBA CRUZADA SALINA RÁPIDA:

Fma: Fase Mayor.    1 gota de glóbulos rojos e donador y  
                                 2 gotas del suero del receptor.

Fme: Fase Menor.    1 gota de glóbulos rojos del receptor y  
                                 2 gotas del suero del donador.

AT: Autotestigo.    1 gota de glóbulos rojos del receptor y  
                                 2 gotas del suero del receptor.

Mezclar y centrifugar a 1500 r.p.m. por 1 min y sacudir suavemente los tubos , buscando aglutinación macroscópica.

#### 4.- PRUEBAS CRUZADAS EN MEDIO PROTEICO.

a) Albúmina rápida: A cada una de las preparaciones ( Fma, Fme y AT ) que se montaron en el paso anterior se les agrega 2 gotas de albúmina bovina a 22% mezclar y centrifugar a 1500 r.p.m. durante 1 min y buscar aglutinación.

b) Albúmina a 37°C por 60 min: Cada una de las siguientes preparaciones volverlas a mezclar e incubar a 37°C durante 60 min. centrifugar a 1500 r.p.m. por un min y buscar aglutinación.

#### 5.- PRUEBA CRUZADA CON COOMBS. ( Suero antiglobulina humana )

Lavar 3 veces con Solución Salina Isotónica ( S.S.I. ), cada uno de los preparados, escurrir perfectamente los tubos después del último lavado adicionar dos gotas de suero antiglobulina humana ( de Coombs) mezclar y centrifugar a 1500 r.p.m. durante 1 min y buscar aglutinación.

#### INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Cuando en ninguno de los tubos ( Fma y Fme ) haya aglutinación, la compatibilidad es perfecta y se puede transfundir sin problema.

Si hay aglutinación en la fase mayor ( Fma ) de la prueba, pero no en la fase menor, únicamente se puede transfundir el plasma.

Si hay aglutinación en la fase menor ( Fme ), pero no en la mayor, únicamente se puede transfundir paquete globular.

Cuando ambas fases ( mayor y menor ) presentan aglutinación la transfusión NO DEBE HACERSE.

RESULTADOS

OBSERVACIONES

CONCLUSIONES.

“ TIPIFICACIÓN DE LOS ANTÍGENOS HLA DE CLASE I POR LA PRUEBA DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD “

Las células del organismo, contienen antígenos que son específicos para cada especie y cuando son transplantadas a otro animal de especie diferente, producen respuesta inmunológica. Dentro de la misma especie, existen también diferencias antigénicas. Cuando la similitud dentro de los animales de una misma especie es marcada, la posibilidad de que las células trnasplantadas sobrevivan es muy grande .

En 1958, Dausset describió el primer grupo leucocitario humano, el grupo Mac. Entonces, rápidamente se hizo evidente la complejidad del sistema de histocompatibilidad del hombre que se llamó HLA ( “leucocito humano” , locus A ). Se organizaron varias reuniones internacionales de trabajo con el objeto de permitir la individualización de más de 25 grupos distintos. Existen dos loci mayores HLA-A y HLA-B. También existe un tercer locus HLA-C localizado entre HLA-A y HLA-B, ligado al segundo locus. Cada alelo HLA controla la síntesis de un producto antigénico llevado por una molécula propia, pero cada una de esas moléculas presenta varios determinantes, algunos propios de la molécula HLA, las especificaciones privadas, y otros compartidos con otras moléculas HLA, las especificidades públicas. (1)

Sobre cada cromosoma, cada individuo tiene un alelo por locus, esos alelos se transmiten como rasgos codominantes; es decir, que siempre se expresan en los heterocigotos. Cada uno de los padres transmite un haplotipo, por lo tanto, los hijos tienen un haplotipo común con cada uno de los padres (semi-identidad ) y los hijos pueden ser idénticos entre sí (cuatro antígenos idénticos), semi-idénticos (dos antígenos comunes) o distintos (cuatro antígenos diferentes). Todavía no se conocen todos los antígenos HLA y por tanto, existen casos en los cuales no se pueden determinar los cuatro antígenos. Las recombinaciones entre los dos loci principales son raras. (11)

**Antígenos de histocompatibilidad.**

Los antígenos que impiden el éxito de los aloinjertos se llaman antígenos de histocompatibilidad, que se encuentran en focos específicos de los cromosomas. Los distintos antígenos de histocompatibilidad no tienen la misma fuerza. Una determinada incompatibilidad para ciertos antígenos entre donador y receptor puede permitir que el tejido injertado sobreviva algunos días o semanas antes de ser rechazado.(13)

Hay tejidos de histocompatibilidad en todos los tejidos, pero en cantidades desiguales. Incluso los eritrocitos poseen estos antígenos, como puede demostrarse por técnicas de absorción de anticuerpos, más que por experimentos de inmunización. Los antígenos de histocompatibilidad potentes suelen limitarse a la membrana celular. (13)

## **Pruebas de Histocompatibilidad.**

Las relaciones de histocompatibilidad se pueden establecer por pruebas in vivo o in vitro. Entre las primeras, la reacción de transferencia de linfocitos normales del donador en la piel de receptor. La intensidad de la reacción cutánea tardía depende directamente de la histocompatibilidad entre donador y receptor.

## **Obtención de células mononucleares a partir de sangre periférica.**

En la mayoría de las pruebas realizadas en el laboratorio de histocompatibilidad se utilizan un tipo particular de células o componentes de la sangre periférica ( suero, granulocitos, linfocitos totales, linfocitos T y B, células mononucleares, eritrocitos, plaquetas y monocitos). Su aislamiento y purificación se basa en propiedades intrínsecas o extrínsecas de cada uno de estos componentes.

Entre las propiedades intrínsecas se encuentran el tamaño, la densidad, viscosidad, adhesividad y granularidad. Entre las extrínsecas están la expresión de marcadores de la superficie celular de receptores y capacidad fagocítica.

Una de las técnicas más usadas actualmente en el laboratorio es la separación de células mononucleares con soluciones de una densidad dada, usando Ficoll-Hypaque, la cual tiene una densidad de 1.077 g/ml que es idéntica a la de linfocitos y monocitos. Éste reactivo es una combinación de un polímero de sacarosa de alto peso molecular (Ficoll) y un compuesto orgánico iodinado (diatrizoato de sodio; 3 - 5 bis acetilamino -2. 4. 6 ácido triyodobenzóico).

Los granulocitos y eritrocitos que tienen una mayor densidad, cuando se centrifuga la sangre en el gradiente de Ficoll-Hypaque, pasan a través de éste formado un paquete en el fondo del tubo. Las plaquetas que tienen una densidad menor permanecen en la fracción plasmática y los mononucleares se localizan en la interfase. Cuando quedan en la interfase algunas plaquetas e pueden eliminar posteriormente centrifugando a una baja velocidad.

También existen otras soluciones para la separación de mononucleares utilizando gradientes de densidad de los que uno muy efectivo es el Percoll. Solución de partículas coloidales que contienen pilivinilpirrolidona, aún cuando éste se usa más frecuentemente para la separación de monocitos, granulocitos, eliminación de blastos y células muertas. Para la separación de células mononucleares es más común el empleo de soluciones como el Lymphoprep, Lymphopure e Hystopaque.(16)

### **Purificación de linfocitos totales a partir de sangre periférica.**

La purificación de linfocitos totales se logra por centrifugación en gradiente de densidad sobre una mezcla de Ficoll-Hypaque (la densidad de la mezcla deberá estar entre 1.076 y 1.078). Después de la centrifugación los eritrocitos y polimorfonucleares se depositan en el fondo, mientras que los linfocitos permanecen cercanos a la interfase entre el suero y la solución separadora.

### **Tipificación de los antígenos HLA-A, B, C.**

La prueba de microlinfocitotoxicidad se usa para delinear el perfil HLA de un individuo, usando un grupo de sueros anti-HLA bien caracterizados. La linfocitotoxicidad es una reacción dependiente del complemento en la que los linfocitos se incuban primero con su antisuero y después con una fuente de complemento fresco de conejo que se mantiene a 70°C. La unión de anticuerpo anti-HLA al antígeno que se haya sobre la superficie de la célula activa a la cascada de complemento, el cual finalmente daña a la membrana de la célula.(16)

El daño se visualiza por la incorporación de un colorante vital a la célula como lo es la eosina amarilla. Cuando un anticuerpo se pega, y se mueren más del 50% de las células se considera que el antígeno HLA está presente.

Los antisueros comerciales identifican a productos de clase I ( HLA A. B. Bw4/Bw6 y C). Ya que los antígenos se expresan en forma autosómica y codominante se pueden obtener un máximo de 10 antígenos además de los Bw4/ Bw6 y los DR42/53; 2 de cada locus HLA. Con frecuencia se identifica menos de 10 debido a:

- a) Exista un antígeno nuevo
- b) No se cuenta con el antisuero para identificarlo
- c) La célula es homocigota para uno o más antígenos ( esto sólo se puede discernir mediante estudios familiares).

Cuando no se encuentre a un antígeno se dice que es un "blanco".

✂ *Ej. A2, - o Ax (A"blanco").*

**Purificación de linfocitos totales a partir de sangre periférica.**

**MATERIAL Y REACTIVOS.**

Solución salina balanceada de fosfatos.

Ficoll 400.

Hypaque 50% (3.5 diacetamida 2,4,6 triyodobenzoato de sodio).

Solución separadora Ficoll-Hypaque: El Hypaque al 50% se diluye con agua a una concentración final del 33.9%, se toman 10 partes de esta solución y se mezclan con 24 partes de una solución acuosa de ficoll a 9%. La densidad de la mezcla deberá estar entre 1.076 y 1.078. Es conveniente esterilizar esta solución por filtración o en autoclave (10 libra por 15 minutos).

Medio RPMI.

**MÉTODO.**

1. Se toma la muestra de sangre por punción venosa. La cantidad de sangre que se requiere depende del propósito de la valoración.
2. Se coloca la sangre en tubos de rosca - con perlas de vidrio - y se desfibrina mecánicamente por rotación.
3. Se diluye la sangre con solución de fosfatos en relación 2:1
4. En un tubo de ensayo (13X100) se colocan 3 ml. De la solución separadora.
5. Se estratifica cuidadosamente la sangre con una pipeta Pasteur dentro de la solución de Ficoll-Hypaque.
6. Se centrifuga a 1 500 rpm durante 30 minutos a temperatura ambiente
7. La banda de linfocitos se recupera con la ayuda de una pipeta Pasteur y se colocan en un tubo de ensayo.
8. Se lavan los linfocitos con solución de fosfatos centrifugando a 2 000 rpm por 10 minutos. Se repite esta operación 2 veces más.
9. Resuspender en 1.0 ml. de medio de cultivo (RPMI).

Las células se cuentan y se ajustan a la concentración de células requerida utilizando medio RPMI.

$$V1C1= V2C2$$

$$V2= V1C1/C2$$

$$V2= (1ml) (182)/4000$$

Tipificación de los antígenos HLA-A,B,C, por microlinfocitotoxicidad.

MATERIAL Y REACTIVOS.

1. Pipetas Pasteur.
2. Tubos de vidrio de 13X150.
3. Microplacas para citotoxicidad.
4. Portaobjetos.
5. Jeringas de 50, 100 y 250 ul.
6. Cámara de Neubauer.
7. Linfocitos humanos. Se aíslan por medio de centrifugación en gradiente de Ficoll-Hypaque.
8. Antisueros. Se utilizan sueros humanos que contienen anticuerpos citotóxicos anti-HLA.
9. Complemento. Se usa suero normal de conejo como fuente de complemento. Los animales se sangran y la sangre se deja coagular a 4°C. Se separa el suero y se mezcla con un volumen igual de glóbulos rojos tipo A (obtenidos de 3 o más donadores). Se incuba durante una hora y se centrifuga a 1 500 rpm durante 15 minutos, a temperatura ambiente. Éste se distribuye en alícuotas y se conserva a -70° C hasta su uso. El complemento así obtenido se deberá probar sobre linfocitos T y sobre B con diluciones 1:2 y 1:4 y con un control positivo y uno negativo. Se comprueba su potencia y su citotoxicidad inespecífica. Si no funciona deberá obtenerse de otro lote de conejos. Puede funcionar para T. Si éste procedimiento resulta inconveniente para el laboratorio, se puede obtener comercialmente. Se utiliza para la tipificación de los loci A,B y C.
10. Eosina amarilla. Se resuspende 5 g de eosina amarilla con un poco de agua en un mortero. Se pasa la suspensión aun matraz aforado de 100 ml y se completa el volumen. Se ajusta el pH a 7.2 - 7.4 y se verifica que el pH sea el correcto, antes de ser utilizado en cada ocasión.
11. Formol. Solución saturada (reactivo al 34%). Se ajusta el pH 7.2 - 7.4
12. Solución balanceada de Hanks normal.
13. Medio TC 199 ó RPMI-1640.
14. Microscopio óptico.
15. Microscopio invertido.
16. Centrifuga Fisher 59.
17. Centrifuga refrigerada.

## MÉTODO.

1. Se coloca 1ul de la suspensión de linfocitos ( $1.5 - 2.5 \times 10^6$  cel/ml) a cada una de las excavaciones de la microplaca que previamente se llenó con los antisueros correspondiente. Se agita uno segundos en vortex. En las cajas con antisueros específicos para los productos de los loci A, B y C se colocan las muestras de linfocitos T y en las cajas con antisueros específicos para los locus DR se colocan las muestras de linfocitos B.
2. Las cajas con antisueros para loci A, B se incuban  $1 \frac{1}{2}$  horas a temperatura ambiente.
3. Se agrega 5 ul de complemento de conejo.
4. Las cajas AB se incuban durante 2 horas.
5. Se agrega 5 ul de solución de eosina al 5%, pH 7.2 - 7.4.
6. Se agita y se deja reposar durante 5 minutos.
7. Se agregan 5 ul de formol pH7.2 - 7.4
8. Se lee en un microscopio invertido de contraste de fase a 250 aumentos. Se calcula el número de células vivas y muertas. En el caso de usar eosina se lee bajo contraste de fases. Si la reacción *Ag-Ac-Complemento* se llevó a cabo, las células se verán aplanadas, opacas y oscuras por efecto de la penetración del colorante (eosina amarilla). Los linfocitos vivos son refringentes y pequeños.
9. Los resultados se informan de la siguiente manera:

0	al 10% de mortalidad	-	(1)
11	al 20% de mortalidad	-/+	(2)
21	al 40% de mortalidad	+/-	(4)
40	al 80% de mortalidad	++	(6)
81	al 100% de mortalidad	+++	(8)

NOTA: Sí se trabaja con linfocitos congelados se recortan los tiempos de incubación con el complemento, como se indica a continuación:

1. Para antígenos clase I, se recorta de 1 hora a 45 minutos

Los sueros anti-HLA y los complementos necesarios para la tipificación de antígenos clase I se pueden adquirir de diversas fuentes comerciales.

A continuación se anexa una tabla en la que se verterán los resultados de la prueba, esta se llena dependiente de la caja ya que esta está dividida por coordenadas, en la parte superior son letras y van de la A a la F y en el lateral izquierdo van números que van del 1 al 12, es por ello el orden de la tabla y lo recomendable es leer en zig-zag

# UNIVERSIDAD AUTONOMA DE QUERETARO

## TIPIFICACION HLA CLASE I

Donador de linfocitos: \_\_\_\_\_

Lugar de procedencia : \_\_\_\_\_

Fecha : \_\_\_\_\_ Leído por: \_\_\_\_\_

RESULTADO : \_\_\_\_\_

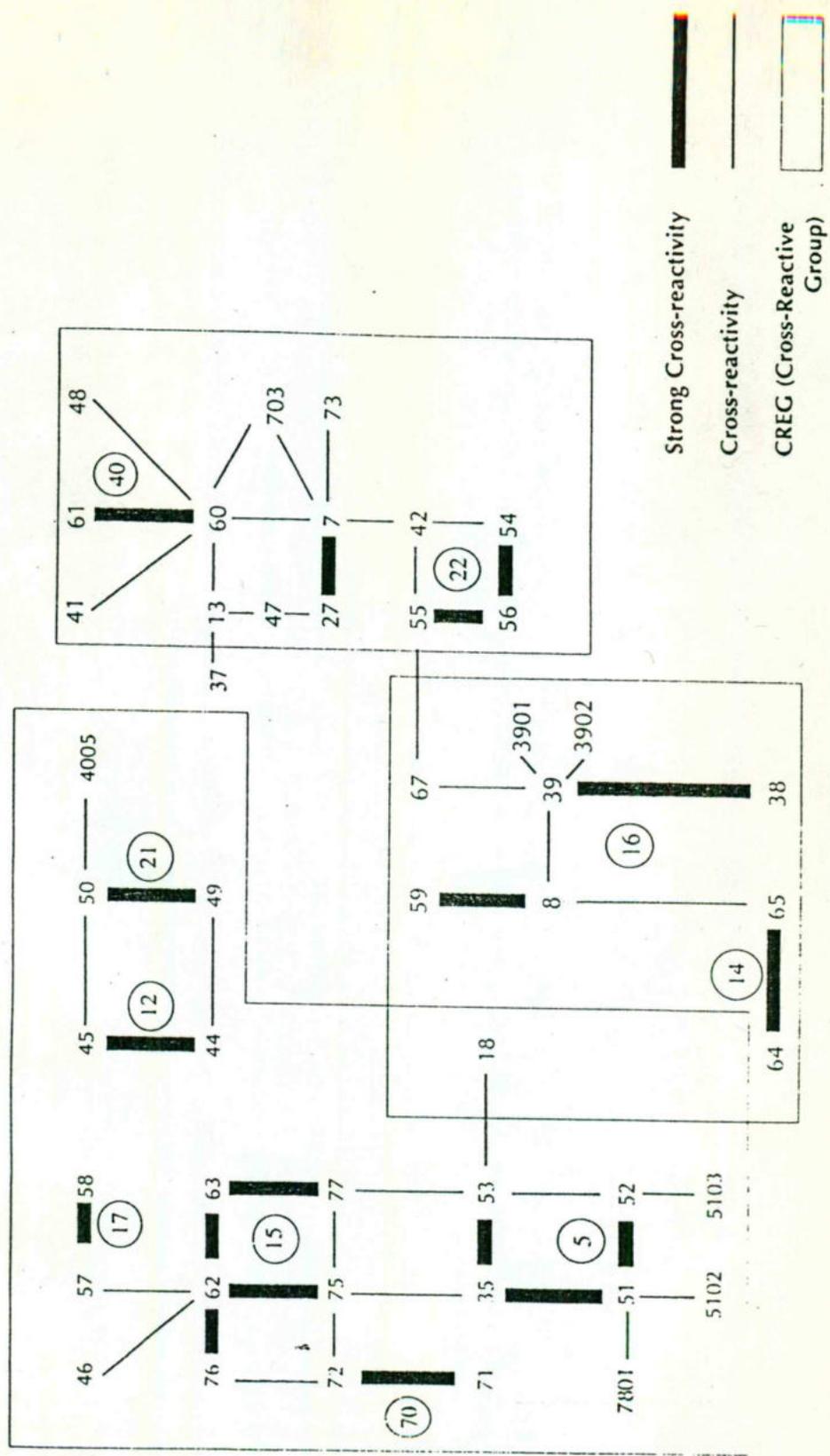
LOTE 4                      AZUL

ANTISUERO	POZO	RESULTADO
C NEGATIVO	1A	
A25	1B	
B51	1C	
B13	1D	
B49	1E	
B37	1F	
B41	2F	
B49	2E	
B13+12+40	2D	
B5+53	2C	
A26	2B	
A1	2A	
A1	3A	
A11+10	3B	
A33+34	3C	
B14	3D	
B49+40	3E	
B42	3F	
B40	4F	
B55	4E	
B14+18	4D	
B35+5	4C	
A11+10	4B	
A1	4A	
A2	5A	
A11+34	5B	
B52+17	5C	
B62	5D	
B22	5E	
B60+48	5F	
B40+13	6F	
B27	6E	
B15	6D	
B7	6C	
A28	6B	
A2	6A	

ANTISUERO	POZO	RESULTADO
A2	7A	
A28+B35	7B	
B7+42	7C	
B35+5+63	7D	
B7+27	7E	
B48	7F	
BW4	8F	
B7+27	8E	
B39	8D	
B8	8C	
A29	8B	
A3	8A	
A3+11	9A	
A30	9B	
B8+14	9C	
B16	9D	
B35+53	9E	
BW4	9F	
BW6	10F	
B35+53	10E	
B57	10D	
B44	10C	
A30+31	10B	
A23	10A	
A24	11A	
CAQ-15	11B	
B12	11C	
B17	11D	
B35+45	11E	
BW6	11F	
C POSITIVO	12F	
B49+52	12E	
B18	12D	
B12+21	12C	
AW19	12B	
A9	12A	



# Cross-reactivity HLA-B Locus





## **PROTEÍNA C REACTIVA**

Las moléculas inertes biológicamente de poliestireno látex son sensibilizadas con anti Proteína C reactiva, obtenida en animales por medio de inmunización. La proteína C reactiva ( PCR) 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 microscópicamente.

La PCR no es específica de un padecimiento en particular, desde su primera descripción relacionada con la neumonía, se ha detectado también en una amplia variedad de enfermedades infecciosas causadas por bacterias gram positivas y gram negativas, así como en diversas enfermedades inflamatorias no infecciosas. Ello aparta a la PCR de la categoría de Ac, clasificándola en la actualidad como un reactivo de fase aguda.(4)

Durante la infección se incrementa la concentración sérica de ciertas proteínas, llamadas *proteínas de fase aguda*. Una de estas es la proteína C reactiva ( PCR), llamada sí porque se une a la proteína C de los neumococos. Esta interacción activa la vía alterna del complemento que, a su vez, puede ayudar a eliminar las bacterias.(13)

En 1930 Tillet y Francis reportaron una reacción de precipitación que podía ser demostrada en el suero de pacientes que padecían neumonía lobar y un extracto de polisacáridos provenientes de cepas de neumococos.

El extracto numococcico era un carbohidrato denominado C y a la proteína humana selectiva capaz de precipitar se le denominó Proteína C Reactiva.

Independientemente de la neumonía lobar, la proteína C reactiva se ha asociado a una gran variedad de enfermedades infecciosas, a procesos inflamatorios no infecciosos y a ciertos padecimientos malignos.(12)

La demostración de niveles elevados de proteína C reactiva es una prueba no especifica de inflamación, la cual es virtualmente positiva en todas la infecciones agudas bacterianas, en algunos estados neoplásicos y en varios tipos de destrucción de tejidos como el infarto al miocardio.

La prueba es usada frecuentemente para monitorear la actividad en pacientes con fiebre reumática y artritis reumatoide.

La regresión del proceso inflamatorio es acompañado en forma general por un decremento en los niveles séricos de proteína C reactiva.(4)

La elevación de la velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG) se acompaña de la presencia de PCR, pero la elevación de ésta ocurre antes que el aumento en la velocidad de sedimentación eritrocitaria, disminuyendo antes que la VSG retorne a los niveles normales. La proteína C reactiva aparece en el suero en la forma de complejo de glicoproteína.(12)

## TÉCNICA.

### Material y Equipo

Pipetas de vidrio de 2.0 y 1.0 mls.  
Pipetas Pasteur  
Placa de vidrio con divisiones.  
Tubos de ensaye de 13 X 100  
Aplicadores de madera.

## REACTIVOS

Equipo comercial que comprende los reactivos para determinación de PCR.  
Suero control positivo  
Suero control negativo.

## METODOLOGÍA

Preparación de la solución de trabajo ( amortiguador salino de glicina )  
El amortiguador concentrado, debe ser diluido en proporción de una parte por cada 19 partes de agua destilada, cada frasco con 10 ml. De concentrado es suficiente para preparar 200 ml. de solución de trabajo a pH de 8.2.

## PROCEDIMIENTO DE LA PRUEBA.

- 1.- Una vez que los reactivos y la muestra se encuentran a la temperatura ambiente, se prepara una dilución 1: 20 del suero problema, diluyendo 0.1 ml del suero con 1.9 ml. De la solución de trabajo.
- 2.- Poner una gota ( aproximadamente 0.05 ml.) del suero diluido en las áreas marcadas de la placa de vidrio.
- 3.- Colocar una gota de los sueros control positivos y negativo respectivamente en las áreas marcadas de la placa.

## **FACTOR REUMATOIDE**

El factor reumatoide por lo regular es un anticuerpo IgM ( 19S) que reacciona con la IgG. La prueba de aglutinación con partículas de látex es hay reumatoide, la gammaglobulina agregada es absorbida sobre partículas de látex, que se aglutinan en presencia del factor reumatoide, esta prueba no es específica, pero sí muy sensible.

En los sueros de paciente con artritis reumatoide se ha encontrado un complejo de globulina 22S que puede separarse en unidades 19S IgM y 7S IgG, lo cual sugiere que el factor reumatoide forma complejos in vivo, que al parecer son eliminados de la circulación sin mayor daño tisular por acción del sistema reticuloendotelial.

Los factores reumatoideos son autoanticuerpos dirigidos contra la globulina gama. Estos factores pueden interferir con la fijación de C<sub>1</sub>q a la porción Fc de moléculas de globulina gama dispuestas en agregados, modificando así o inhibiendo la actividad del complemento. Pueden promover ó interferir con la fagocitosis según compitan o no con otras opsoninas.

Los “ Factores Reumatoideos “ son reactivos contra IgG de algunos ( pero no todos ) individuos normales. Tales factores reumatoideos detectan determinantes alotípicos.(13)  
El factor reumatoide es un anticuerpo circulante que reacciona con algunos componentes de inmunoglobulinas.

La especificidad de la reacción es variable por lo regular, se identifican tres formas de reacción específica:

- 1.- Reacción inmunoglobulinas extrañas ( de conejo o de caballo ).
- 2.- Reacción a inmunoglobulinas humanas ( IgG humana desnaturalizada )
- 3.- A inmunoglobulinas autólogas ( la propia IgG del paciente )

El factor reumatoide por lo regular es un anticuerpo IgM, IgG ó IgA ( 19S), que reacciona con uno o más de los antígenos señalados.(3)

La producción de dicho factor es resultado de la respuesta por parte del huésped hacia uno o más determinantes antigénicos específicos presentes en sus propias gammaglobulinas. El factor suele ser detectado por aglutinación de partículas ( eritrocitos o látex ), recubiertos con gammaglobulinas, también reacciona con complejos antígeno-anticuerpo, en casi todos los casos el factor reumatoide ( anti IgG), forma grandes complejos solubles con IgG in vivo, que al parecer son eliminados de la circulación sin mayor daño tisular por acción de sistema reticuloendotelial.

En raros casos los complejos, factor reumatoide-inmunoglobulina son solubles a temperatura corporal, pero se pueden precipitar en el suero, por el frío ( crioglobulina ) los individuos que tienen crioglobulinas muestran mayor propensión a sufrir lesiones secundarias ( vasculitis ) , tal vez por la presencia in vivo de complejos circulantes solubles.

En la artritis reumatoide, los niveles séricos de factor reumatoide guardan correlación precisa con la aparición de nódulos subcutáneos, la presencia de artritis deformante y el ataque generalizado de la enfermedad.

El factor reumatoide está constituido por inmunoglobulinas con especificidad para el fragmento Fc de la IgG.

La mayoría de los métodos de los laboratorios detectan el factor reumatoide IgM 19S, pero también se observan propiedades del factor reumatoide tanto en las inmunoglobulinas IgM en IgG 7S como en la IgA.

El factor reumatoide está presente en enfermos con artritis reumatoide, lupus eritematoso generalizado, artritis reumatoide juvenil, Síndrome de Sjögren, esclerosis generalizada progresiva, mononucleosis infecciosa y en algunos pacientes con polimiositis.

La prueba de aglutinación con partículas de látex es hoy en día el método más comúnmente empleado para la detección del factor reumatoide, la gammaglobulina agregada ( fracción II de Cohn ), es adsorbida sobre partículas de látex, que se aglutinan en presencia del factor reumatoide, la prueba de aglutinación con partículas de látex no es específica, pero sí muy sensible.(3)

#### TÉCNICA:

##### Material y Equipo

- Pipetas de 1 ml.
- Pipetas Pasteur
- Aplicadores de madera
- Tubos de ensayo de 13 X 100
- Placas de vidrio con óvalos.
- \* Baño María.

#### REACTIVOS.

Equipo comercial que comprende los reactivos para determinación de factor reumatoide.

- Frasco con 5 ml de látex sensibilizado.
- Frasco con 60 ml de solución amortiguadora
- Frasco con suero control positivo
- Frasco con suero control negativo.

## METODOLOGÍA.

- 1.- Inactivar el suero a 56°C por 30 min para eliminar un elemento termolábil que puede bloquear la reacción pudiendo producirse falsas negativas.
- 2.- Permitir que los reactivos y muestras alcancen la temperatura ambiente.
- 3.- Preparar una dilución 1:20 del suero problema diluyendo 0.1 ml del suero con 1.9 ml de solución amortiguadora.
- 4.- Poner una gota ( aproximadamente 0.05 ml ) del suero diluido en algunos de los óvalos de la placa de vidrio.
- 5.- colocar ( aproximadamente 0.05 ml ) de suero control positivo y control negativo en los óvalos de la placa de vidrio.
- 6.- Homogeneizar el reactivo de látex y añadir 1 gota a cada uno de los sueros y controles.
- 7.- Mezclar con un aplicador diferente para cada área. Rotar la placa de forma circular por 2 a 4 min.
- 8.- Observar inmediatamente la aglutinación utilizando una fuente de luz directa, Comparar las reacciones del suero y de los controles.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

La aglutinación de las partículas de látex indica una reacción positiva.

La no aglutinación o una ligera aparición de granulosidad que no exceda a la observada en el control negativo, indica un resultado negativo.

Los sueros positivos deben someterse a la prueba cuantitativa para obtener los títulos de Factor Reumatoide respectivos.

## PROCEDIMIENTO CUANTITATIVO.

Preparar una serie de diluciones usando como factor 2 tomando en cuenta que se debe partir el suero diluido 1: 20. Si la última dilución del suero continuara mostrando aglutinación se sugiere utilizar un factor más alto comenzando por 1:20 hasta 1:164 y si en esta ultima persistiera la positividad de debe realizar diluciones mayores.

El resto del procedimiento se lleva a efecto igual que en la prueba cualitativa.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

La aglutinación del látex sensibilizada con gammaglobulinas indica que el suero probado contiene factor reumatoide.

En la prueba cuantitativa el título está dado por la recíproca de la máxima dilución del suero que muestra aglutinación.

La ausencia de aglutinación indica una reacción negativa.

RESULTADOS

OBSERVACIONES.

CONCLUSIONES.

*DETERMINACIÓN DE HORMONA GONADOTROPINA CORIONICA HUMANA  
(HGC)*

Cuando tienen lugar la fecundación e implantación, el cuerpo lúteo se conserva durante los tres o cuatro meses del embarazo, en los cuales secreta estrógenos y progesterona. Tal conservación depende de la gonadotropina coriónica humana, hormona que sintetiza la placenta en desarrollo. Esta también secreta estrógenos, que conservan el embarazo, y progesterona, que tienen esta misma función y la del desarrollo de las mamas para la lactación.

Las distintas pruebas utilizadas actualmente para reconocer la presencia de HGC en la orina dependen de la especificidad de una reacción Ag-Ac.

La prueba se puede realizar según dos técnicas principales, que difieren respecto al portador utilizado para la fuente externa de HGC. En una variedad se mezcla una gota de la orina del paciente con una gota de un antisuero que contenga anticuerpos contra la HGC. La HGC de la orina reacciona con el antisuero y lo neutraliza. Luego, la mezcla ya no puede reaccionar con la HGC situada en partículas de látex de una suspensión que se añade a continuación y no hay aglutinación de dichas partículas.(13).

Si la orina de prueba no contiene HGC, el antisuero no se neutraliza; al añadir luego la suspensión de partículas de látex cubiertas de HGC, el antisueo todavía activo reacciona con la hormona, y las partículas se aglutinan.

En la otra técnica, la HGC externa del sistema se fija a glóbulos rojos de carnero, que se llaman entonces sensibilizados a la HGC. La orina de prueba se mezcla con suero anti-HGC, y luego con una suspensión de los glóbulos rojos sensibilizados. Si la orina contiene HGC, neutraliza el suero anti-HGC, y no se observa efecto alguno sobre los glóbulos sensibilizados; caen al fondo del tubo, donde forman un anillo neto. Si la orina no contiene HGC, el antisuero todavía activo aglutina los glóbulos rojos sensibilizados y éstos forman una capa homogénea en el fondo del tubo de ensayo.(7)

TECNICA:

Neo-Planotest ® 200

Neo-Planotest 200 es una prueba de aglutinación de látex directa sobre portaobjetos para la detección de la gonadotropina corionica humana ( HGC) en orina.

## FUNDAMENTO:

La prueba está basada en una reacción de aglutinación de látex directa, utilizando partículas de látex recubiertas con anti-HGC. La HGC, que se encuentra en la orina de mujeres embarazadas, se mezclará con el reactivo de látex y los anticuerpos reaccionarán con la HGC para formar un patrón de aglutinación de látex granulosa ( reacción positiva ). Si la HGC no está presente en la orina, no se producirá ninguna aglutinación al mezclarla con el reactivo de látex ( reacción negativa ).

## Material y Equipo

Pipetas desechables  
Cápsulas para succionar con las pipetas  
Espatulas desechables  
Portaobjetos desechables

## REACTIVOS.

Reactivo de látex ( monoclonal, de ratón ). Partículas rojas de látex suspendidas y recubiertas con anti-HGC.

## METODOLOGIA

- 1.- Colocar el portaobjetos sobre una superficie horizontal
- 2.- Agitar suavemente el reactivo de látex durante 15 segundos para obtener una suspensión homogénea ( no es necesario llevar el reactivo a temperatura ambiente antes del uso ).
- 3.- Aspirar lentamente con una pipeta y una cápsula para succionar la cantidad suficiente del reactivo de látex y transferir una gota cayendo libremente ( 25 $\mu$ l ) sobre el área de prueba del portaobjetos.
- 4.- Devolver al vial el reactivo de látex restante de la pipeta.
- 5.- Utilizando la misma pipeta, aspirar lentamente la muestra de orina y transferir dos gotas, cayendo libremente ( 50  $\mu$ l), a la misma área de prueba. Desechar la pipeta con la orina restante.
- 6.- Mezclar con una espátula el reactivo de látex y la orina, y esparcir la mezcla sobre todo el área de prueba. Desechar la espátula.
- 7.- Balancear suavemente el portaobjetos dejando que el líquido fluya lentamente dentro del círculo de prueba hasta dos minutos.
- 8.- Colocar el portaobjetos sobre una superficie horizontal bien delimitada para la lectura del resultado.

## INTERPRETACION DE RESULTADOS.

Una reacción positiva viene indicada por la producción de una aglutinación de látex granulosa y roja, en el plazo de 2 minutos.

Una reacción negativa corresponde al mantenimiento de una suspensión de látex uniforme y roja al final del período de 2 minutos.

En el caso de muestras de orina conteniendo concentraciones elevadas de HGC, la aglutinación ocurrirá en el plazo de 1 minuto y, por tanto no es necesario continuar el balanceo hasta e final de período de 2 minutos.

En el caso de muestras de orina conteniendo concentraciones bajas de HGC, o en el caso de orinas negativas, el balanceo debe continuarse hasta 2 minutos.

## CARACTERISTICAS DE LA PRUEBA

### *Sensibilidad.*

La sensibilidad de Neo-Planotest 200 es de 200 UI /1 de HGC

En embarazos normales, la prueba dará una reacción positiva a partir de dos días después de la menstruación esperada.

### *Especificidad.*

En el caso de anticuerpos monoclonales en Neo-Planotest 200 asegura el alto grado de especificidad de la prueba frente a la HGC. La reactividad cruzada con HLH es baja.

Por eso los niveles elevados de HLH producidos durante la evolución y post-menopausia no producen resultados positivos.

### Neogen-Hai

#### *Beta específico.*

Para la detección cualitativa y semicuantitativa de gonadotropina coriónica humana en orina y suero mediante la inhibición de la hemaglutinación por anticuerpos dirigidos contra la fracción beta de la HGC.

Neogen-Hai Beta específico es un inmunoensayo para la detección de la hormona gonadotropina coriónica humana en orina o suero.

La HGC es una glicoprotéina secretada por el tejido trofoblastico de la placenta al momento de ocurrir la implantación del óvulo fecundado.

En un embarazo normal, la concentración de HGC aumenta rápidamente en orina y suero hasta alcanzar su nivel máximo al rededor de la 10a semana.

La prueba se basa en el reconocimiento específico de la subunidad beta de la HGC mediante la reacción de la inhibición de la hemaglutinación. La sensibilidad del ensayo es de 100 UI de HGC /1 de acuerdo al primer patrón internacional de referencia para inmunoensayos.

De acuerdo a su sensibilidad la prueba detecta niveles de HGC en orina que se alcanza generalmente al 5o día de amenorrea.

## FUNDAMENTO

Cuando los eritrocitos fijados son tratados con ácido tánico diluído adquieren la propiedad de absorber glicoproteínas como la HGC. Estas glicoproteínas que recubren y " sensibilizan " a los eritrocitos son los responsables de la aglutinación (hemaglutinación ) de los mismos por anticuerpos que reaccionan específicamente con la fracción beta de la HGC provocando un patrón de aglutinación difuso en el fondo de los tubos de reacción ( reacción negativa).(1)

La presencia simultánea de HGC libre presente en la orina o suero de mujeres embarazadas bloquea los anticuerpos y evita la reacción con los eritrocitos " sensibilizados " ( inhibición de la hemaglutinación ) permitiendo sus sedimentación anular ( reacción positiva ).

## Material y Equipo.

Tubos de fondo semiesférico  
Frasco con eritrocitos de carnero sensibilizados con HGC  
Frasco con suero anti-HGC de conejo fracción beta  
Pipetas desechables  
Gotas

## MANEJO DE LAS MUESTRAS.

Debido a su mayor contenido de HGC, utilizar de preferencia la primera orina de la mañana.

Para evitar la pérdida de HGC, la orina debe procesarse dentro de las primeras cuatro horas de excretada. De ser necesario debe conservarse en refrigeración por no más de dos días o bien congelarse por no más de un año.

si la orina no ha sido enfriada, refrigerarla durante 5 min.

Eliminar el material insoluble precipitado, centrifugando a 3000 r.p.m. durante 5 minutos o filtrar.

## METODO CUALITATIVO ( PARA ORINA )

Utilizar orina libre de material insoluble precipitado como se indica en manejo de muestras.

1.- Por cada orina a probar, colocar 1 tubo en posición vertical ( de los proporcionados en el equipo ) en una gradilla provista de un espejo inclinado en su base.

2.- Adicionar con una pipeta desechable 0.25ml de sueroanti-HGC y agitar lentamente.

3. Resuspender los eritrocitos de carnero sensibilizados con HGC y adicionar una gota ( con el gotero proporcionado ).

4.- Agitar lentamente para homogeneizar la solución.

colocar la gradilla en un lugar libre de vibraciones o calor excesivo.

La lectura de los resultados debe realizarse a las 2 hrs.

#### METODO SEMICUANTITATIVO.

Para calcular la concentración aproximada d hCG en una muestra o de la orina recolectada durante 24 hrs.

1. En 9 tubos realizar diluciones seriadas utilizando 0.25ml de solución salina. Probar cada dilución como se indica en le método cualitativo. Hasta encontrar la última dilución en donde el resultado es positivo. D= Factor de dilución.

2. Definir la concentración de hCG 7l de orina ( UI /l de hCG) de acuerdo con la siguiente fórmula.

$$( \text{UI/l de hCG} ) = \text{SD}$$

Donde D= Factor de dilución

s= Sensibilidad de la prueba = 1000 UI/l de hCG

#### INTERPRETACION DE RESULTADOS.

*Reacción positiva.* La hemaglutinación es inhibida en consecuencia, los eritrocitos no se une a la superficie semiesférica del tubo de reacción y tienden a sedimentar formando un anillo " con paredes acolchonadas " de diámetro diferente para cada muestra y con tendencias a formar un botón en el fondo de tubo.

RESULTADOS

OBSERVACIONES

CONCLUSIONES

## ELECTROFORESIS

El sistema para proteínas de Ciba Corning es empleado en la determinación cualitativa y cuantitativa de proteínas en suero, líquido cefalorraquídeo y orina por medio de electrofóresis.

El suero de personas adulta normales está compuesto por más de 125 proteínas identificadas. Estas proteínas pueden separarse en cinco bandas distintas por medio de electrofóresis: albúmina, proteínas alfa 1, alfa 2, beta y gamma. La albúmina es el principal componente y presenta mayor movilidad. Los cambios en los patrones normales, así como la presencia de componentes extraños, o un incremento o decremento en los componentes presentes normalmente, pueden indicar la posibilidad de un estado patológico y alertan al médico para que inicie un estudio proteico con mayor profundidad.(13)

Las proteínas son separadas por medio de electroforesis en un sistema de agarosa amortiguado. Después de la electrofóresis las bandas de proteínas son reveladas con colorantes universal (amido negro).

### MATERIALES SUMINISTRADOS

Para emplearse en el diagnóstico in vitro.

El estuche de proteínas séricas/8 No. catálogo 470696 esta compuesto por:

Gel universal 11/8 (10 geles)

Guías para la aplicación de muestras/8 (10)

Amortiguador universal (1 vial)

Colorante universal (1 vial)

Control 3 en 1 (nivel I)	470630
Control 3 en 1 (nivel II)	476032
Dispensador universal de muestras	470152
Puntas cortas de teflón	470154
Celda universal de electrofóresis	470130
Fuente de poder de 90 volt.	470134
Incubador/estufa.	470041
Procesador universal de geles	470173
Charolas de reacción	470160/ 470162
Acido acético glacial	
Agua deionizada	
Agitador magnético y barras mezcladoras.	

■ PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Concentre las muestras de orina y líquido cefalorraquídeo a 1 g/dL antes de correr la electrofóresis.

■ PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Amortiguador universal: pH 8.6

Disuelva el contenido del vial en 2 litros de agua deionizada. Mezcle empleando un agitador magnético y una barra mezcladora hasta disolución total del soluto (aproximadamente 2 horas). Almacene el amortiguador reconstituido en un contenedor hermético a temperatura ambiente (18°C a 25°), durante dos meses o hasta su fecha de caducidad, lo que ocurra primero. Descarte la solución si se presenta turbidez o precipitación.

Solución de ácido acético al 5%.- Adicione 50 ml de ácido acético glacial a 950 ml de agua deionizada. Almacene la solución en un contenedor hermético a temperatura ambiente, (18, 25° C

Tabla de ingredientes, almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro.

	INGREDIENTES	ALMACENAMIENTO	ESTABILIDAD	SEÑALES DE DETERIORO
el universal II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agarosa</li> <li>• Amortiguador</li> <li>• Barbitol al 5%</li> <li>• Azida de sodio 0.1%</li> <li>• Ingredientes no reactivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 - 25° C</li> <li>• Almacene sobre plataformas en su empaque original</li> <li>• Después de abrir adicione 0.5 ml de agua deionizada y reselie.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasta la fecha de caducidad</li> <li>o una semana después de abierto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fractura</li> <li>• Cristalización</li> <li>• Pérdida de claridad</li> </ul>

	INGREDIENTES	ALMACENAMIENTO	ESTABILIDAD	SEÑALES DE DETERIORO.
Amortiguador Universal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barbitol sódico 16.7 g. (43mM al reconstituir)</li> <li>• Barbitol 2.5 g. (7mM al reconstituir)</li> <li>• Ingredientes no reactivos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 - 25° C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasta la fecha de caducidad.</li> </ul>	
Colorante Universal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amido negro 10NB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 - 25°C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasta la fecha de caducidad</li> </ul>	

Colorante universal:

Se lava el contenido del vial en un litro de ácido acético al 5%:

Se hace empleando un agitador magnético y una barra mezcladora hasta disolución total del soluto (aproximadamente 1 hora). Almacene colorante reconstituido dentro de un contenedor hermético a temperatura ambiente (18°C. a 25°C). Hasta por 3 meses o la fecha de caducidad, lo que ocurra primero. Descarte el colorante si la solución presenta precipitación.

#### INSTRUCCIONES PASO A PASO

Instalación del equipo de electroforesis.

- Encienda la estufa
- Llene cada cámara de la base de la celda electroforética con 95 ml. de solución de solución amortiguadora universal. No reutilice esta solución.
- Conecte la base de la celda electroforética a la fuente de poder de 90 volts.
- Prepare el procesador universal de geles ó las charolas de reacción de la manera siguiente:

- Procesador universal de geles. Referirse a las instrucciones de uso del equipo.
- Charolas de reacción.

- A. Coloque 200 ml de colorante universal dentro de una charola de reacción. Descarte el colorante después de procesar 6 geles.
- B. Coloque 200 ml de solución de ácido acético al 5% en cada una de tres charolas de reacción. Al final del proceso, rote las soluciones de ácido acético descartando la primera solución y reemplazando la solución del último contenedor con solución fresca.

## **2. Preparación de geles.**

- a. Remueva los geles de su contenedor de aluminio y descarte el soporte de plástico colocado entre ellos.
- b. Tome la cubierta de plástico duro por la parte superior.
- c. Tome la esquina del gel y sepárelo suavemente de la cubierta.
- d. Maneje el gel únicamente por la orilla y colóquelo, sobre la plataforma con el lado de agarosa hacia arriba.
- e. Seque el área de aplicación de la muestra centrando una tira de papel secante sobre la guía de aplicación colocada sobre la superficie del gel.
- f. Remueva el papel secante tan pronto como se humedezca y desecho.
- g. Tome la guía de aplicación de muestras y dóblela como se muestra en la ilustración.
- h. Coloque la guía de aplicación de manera que las perforaciones de esta queden alineadas y bien centradas sobre los canales del gel. Si existe alguna burbuja alrededor de las perforaciones, frote suavemente con el dedo sobre la guía de aplicación para removerla.

## **3. APLICACIÓN DE MUESTRAS.**

- a. Empleando el dispensador universal de muestra y una punta desechable, aspire la muestra y elimine el exceso de muestra de la punta con un paño limpio.
- b. Coloque 0.7  $\mu$ l de control o muestra a cada perforación de la guía de aplicaciones. Aplique la muestra de manera que se forme una gota en la punta antes de aplicarla sobre la guía de aplicación. La muestra debe llenar el pozo completamente por capilaridad.
- c. Deje pasar 2 minutos después de aplicar la última muestra para su difusión.
- d. Remueva suavemente la guía de aplicación y deséchela.

## **4. Ejecución de la electrofóresis**

- a. Inserte el gel dentro de la cubierta de la celda electroforética, con el lado de agarosa hacia arriba, colocando el cátodo ( - ) y ánodo ( + ) de la cubierta con los del gel, respectivamente.
- b. Coloque la cubierta sobre la base. Encienda la fuente de poder.
- c. Deje correr la electrofóresis durante 25 minutos.
- d. Remueva la cubierta y sin invertirla, colóquela horizontalmente sobre un papel o toalla para eliminar la humedad rápidamente.

## 5. Tinción de geles

- a. Coloque el gel dentro de la solución de colorante universal durante 10 minutos. Nota: si emplea el procesador universal de geles, referirse a las instrucciones de uso del equipo.
- b. Coloque el gel dentro de la primera solución de ácido acético al 5% y agite suavemente durante 30 segundos.
- c. Remueva el gel y elimine la humedad de la parte posterior del mismo.
- d. Coloque el gel en la estufa y séquelo durante 20 minutos a 55° C ó hasta que seque.
- e. Retire el gel de la estufa y déjelo enfriar 1 ó 2 minutos.
- f. Coloque el gel dentro de la primera solución de ácido acético al 5% y agite suavemente durante 1 minuto.
- g. Coloque el gel dentro de la segunda solución de ácido acético al 5% y agite suavemente durante 1 minuto ó hasta eliminar la humedad de la parte posterior del mismo.
- h. Coloque el gel dentro de la tercera solución de ácido acético al 5% y agite suavemente durante 1 minuto, o hasta eliminar el exceso de colorante.
- i. Remueva el gel y elimine la humedad de la parte posterior del mismo.
- j. Coloque el gel dentro de la estufa y séquelo por 10 minutos a 55° C ó hasta que seque.
- k. Interprete los resultados visualmente ó analícelo en su densitómetro a la longitud de onda recomendada.

### ■ CONTROL DE CALIDAD

Se recomienda la inclusión de un control, tal como el control 3 en 1 de Ciba Corning, en cada gel. Éste control sirve como referencia en la identificación y cuantificación de las bandas proteicas. Los valores del análisis están incluidos junto con el control.

### ■ RESULTADOS

Para el análisis cualitativo; interpreta visualmente la localización e intensidad del patrón proteico, consistente en cinco bandas, comparativamente con el patrón de un control normal.

Para el análisis cuantitativo; un densitómetro calcula el porcentaje relativo para cada banda proteica, éste porcentaje multiplicado por el valor total de proteínas séricas, dará el valor absoluto para cada banda.

La presencia de bandas proteicas extra, o el incremento o decremento de las bandas presentes normalmente debe dar pie a un estudio más profundo.

■ LIMITACIONES

- a. Las muestras hemolizadas pueden sufrir incremento en el valor del alfa 2.
- b. Las muestras de plasma mostrarán una banda de fibrinógeno entre las bandas beta y gamma.
- c. La elevación anormal de las bandas alfa 2 y beta, o bandas adicionales en esta región puede ser debido a la migración rápida de proteínas monoclonales y deberá investigarse con una prueba de inmunofijación.
- d. Debido al incremento en la sensibilidad del gel universal II, la banda correspondiente a las lipoproteínas, beta puede observarse dentro de la región alfa 2.

■ VALORES ESPERADOS

Una población de 88 adultos, hombres y mujeres, sin enfermedades conocidas aportaron muestras para la fijación de un intervalo de referencia. Las muestras estudiadas sobre gel universal II mostraron la siguiente distribución de proteínas, -calculándose el valor promedio <sup>+/-</sup> 2 desviaciones estándar.

Albúmina	-	53.2	. 71.2%
Alfa 1	-	1.8	. 15.7%
Alfa 2	-	6.4	. 12.8%
Beta	-	7.7	. 15.7%
Gamma	-	6.9	. 19.3%

Se recomienda que cada laboratorio establezca su propio intervalo de referencia.

## INMUNOELECTROFORESIS.

Las modificaciones que hay entre una electroforesis de proteínas y la inmunolectroforesis, aparte de algunos componentes extras, la inmunolectroforesis identifica compuestos protéicos específicos. La inmunolectroforesis es un método específico para una rápida identificación de proteínas específicas separándolas por electroforesis. Este proceso es la combinación e una electroforesis de proteínas y la subsecuente reacción de antisueros monoespecíficos con la separación de proteínas. La fácil interpretación de el complejo anticuerpo - antígeno, identifica proteínas específicas anormales, especialmente de gammapatias monoclonales.

Las proteínas son separadas en bandas decrecientes por una electroforesis proteica en un buffer sobre un sistema de agarosa. Después de la electroforesis, un antisuero monoespecifico es adicionado al gel y el complejo antígeno-anticuerpo forma un sitio de reacción. El gel es procesado para remover proteínas y anticuerpos sin procesar. Las zonas de precipitación se les adiciona colorante universal.

La interpretación se hace comparando la localización de la zona de precipitación con la zona protéica de referencia.

### MATERIALES SUMINISTRADOS

Para emplearse en el diagnóstico in vitro.

El estuche de Inmunofijación /12 No. catálogo 470685 esta compuesto por:

Gel universal 11/12 (10 geles)

Guías para la aplicación de muestras/12 (10)

Amortiguador universal (1 vial)

Colorante universal (1 vial)

Reactivos del Kit de inmunofijación.

Proteínas fijadoras ( 1 vial )

antisuero IgG (1 vial )

Antisuero IgA (1 vial )

Antisuero IgM ( 1 vial )

Antisuero Kappa ( 1 vial )

Antisuero lambda ( 1 vial )

### MATERIAL REQUERIDO NO PROVISTO.

Dispensador universal de muestras	470152
Puntas cortas de teflón	470154
Celda universal de electroforesis	470130
Fuente de poder de 90 volt.	470134
Papel para secar	470219

Incubador/estufa.	470041
Procesador universal de geles	470173
Charolas de reacción	470160/ 470162
Acido acético glacial	
0.85% de Cloruro de Sodio	
Agua desionizada	
Agitador magnético y barras mezcladoras.	

#### ■ PREPARACIÓN DE LA MUESTRA.

Utilice suero fresco, líquido cefalorraquídeo, o muestras de orina. El plasma no es una muestra recomendable, ya que interferirá en el gel de agarosa.

#### ■ PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Amortiguador universal: pH 8.6

Disuelva el contenido del vial en 2 litros de agua desionizada. Mezcle empleando un agitador magnético y una barra mezcladora hasta disolución total del soluto (aproximadamente 2 horas). Almacene el amortiguador reconstituido en un contenedor hermético a temperatura ambiente (18°C a 25°), durante dos meses o hasta su fecha de caducidad, lo que ocurra primero. Descarte la solución se presenta turbidas o precipitación.

Solución de ácido acético al 5%.- Adicione 50 ml de ácido acético glacial a 950 ml de agua desionizada. Almacene la solución en un contenedor hermético a temperatura ambiente, (18, 25° C)

Tabla de ingredientes, almacenamiento, estabilidad y señales de deterioro.

	INGREDIENTES	ALMACENAMIENTO	ESTABILIDAD	SEÑALES DE DETERIORO
Gel universal II	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agar agarosa</li> <li>• Amortiguador Barbitol al 5%</li> <li>• Azida de sodio 0.1%</li> <li>• Ingredientes no reactivos</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 - 25° C</li> <li>• Almacene sobre plataformas en su empaque original</li> <li>• Después de abrir adicione 0.5 ml de agua desionizada y reselle.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasta la fecha de caducidad o una semana después de abierto</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Fractura</li> <li>• Cristalización</li> <li>• Pérdida de claridad</li> </ul>

	INGREDIENTES	ALMACENAMIENTO	ESTABILIDAD	SEÑALASE DE DETERIORO.
Amortiguador universal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Barbitol sódico 16.7 g. (43mM al reconstituir)</li> <li>• Barbitol 2.5 g. ( 7mM al reconstituir)</li> <li>• Ingredientes no reactivos.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 - 25° C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasta la fecha de caducidad.</li> </ul>	
Colorante Universal	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Amido negro 10NB</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 18 - 25° C</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hasta la fecha de caducidad</li> </ul>	

Colorante universal:

Disuelva el contenido del vial en un litro de ácido acético al 5%:

Mezcle empleando un agitador magnético y una barra mezcladora hasta disolución total del soluto ( aproximadamente 1 hora ). Almacene colorante reconstituido dentro de un contenedor hermético a temperatura ambiente ( 18°.C. a 25°. C). Hasta por 3 meses o la fecha de caducidad, lo que ocurra primero. Descarte el colorante si la solución presenta precipitación.

## INSTRUCCIONES PASO A PASO

### 1. *Instalación del equipo de electroforesis.*

- a) Encienda la estufa
- b) Llene cada cámara de la base de la celda electroforética con 95 ml. de solución de solución amortiguadora universal. No reutilice esta solución.
- c) Conecte la base de la celda electroforética a la fuente de poder de 90 volts.
- d) Prepare el procesador universal de geles ó las charolas de reacción de la manera siguiente:

1. Procesador universal de geles. Referirse a las instrucciones de uso del equipo.
2. Charolas de reacción.

- A. Coloque 200 ml de colorante universal dentro de una charola de reacción. Descarte el colorante después de procesar 6 geles.
- B. Coloque 200 ml de solución de ácido acético al 5% en cada una de tres charolas de reacción. Al final del proceso, rote las soluciones de ácido acético descartando la primera solución y reemplazando la solución del último contenedor con solución fresca.

### 2. *Preparación de geles.*

- a. Remueva los geles de su contenedor de aluminio y descarte el soporte de plástico colocado entre ellos.
  - b. Tome la cubierta de plástico duro por la parte superior.
  - c. Tome la esquina del gel y sepárelo suavemente de la cubierta.
- 
- a. Maneje el gel únicamente por la orilla y colóquelo, sobre la plataforma con el lado de agarosa hacia arriba.
  - b. Seque el área de aplicación de la muestra centrado una tira de papel secante sobre la guía de aplicación colocada sobre la superficie del gel.
  - c. Remueva el papel secante tan pronto como se humedezca y deseche.
  - d. Tome la guía de aplicación de muestras y dóblela como se muestra en la ilustración.
- 
- h. Coloque la guía de aplicación de manera que las perforaciones de esta queden alineadas y bien centradas sobre los canales del gel. Si existe alguna burbuja alrededor de las perforaciones, frote suavemente con el dedo sobre la guía de aplicación para removerla.

### 3. APLICACIÓN DE MUESTRAS.

- a. Empleando el dispensador universal de muestra y una punta desechable, aspire la muestra y elimine el exceso de muestra de la punta con un paño limpio.
- b. Disperse la muestra en su carril, esta se depositara por capilaridad para dos pacientes, la secuencia es la siguiente.

Carril	Muestra
1	1.0µl de suero no diluido del paciente 1 ( suero de referencia)
2	1.0µl de suero diluido del paciente 1
3	1.0µl de suero diluido del paciente 1
4	1.0µl de suero diluido del paciente 1
5	1.0µl de suero diluido del paciente 1
6	1.0µl de suero diluido del paciente 1
7	1.0µl de suero no diluido del paciente 2 ( suero de referencia)
8	1.0µl de suero diluido del paciente 2
9	1.0µl de suero diluido del paciente 2
10	1.0µl de suero diluido del paciente 2
11	1.0µl de suero diluido del paciente 2
12	1.0µl de suero diluido del paciente 2

- c. Deje pasar 2 minutos después de aplicar la última muestra para su difusión.
- d. Remueva suavemente la guía de aplicación y deséchela.

### 4. Ejecución de la electroforesis

- a. Inserte el gel dentro de la cubierta de la celda electroforética, con el lado de agarosa hacia arriba, colocando el cátodo ( - ) y ánodo ( + ) de la cubierta con los del gel, respectivamente.
- b. Coloque la cubierta sobre la base. Encienda la fuente de poder.
- c. Deje correr la electroforesis durante 25 minutos.
- d. Remueva la cubierta y sin invertirla, colóquela horizontalmente sobre un papel o toalla para eliminar la humedad rápidamente.
- e. Pipetear de 2 a 3 descargas de agua en la placa
- f. Remueva el gel de la cubierta y ponga el gel de agarosa en un plato seco.
- g. cuidadosamente presione el gel para adherirlo a el plato.

**5. Aplique los antisueros y las proteínas de unión.**

- a. Cuidadosamente sostenga y presione una papel absorbente en la superficie del gel. Retire el papel tan rápido como crea que el gel queda húmedo y deséchelo.
- b. Ponga la placa de antisuero cuidando que el riel quede por el centro y presione suavemente las cuatro esquinas para asegurar su ajuste.
- a. Remueva el gel y elimine la humedad de la parte posterior del mismo.
- b. Aplique 60µl de proteína a cada ranura en el orden que aparece a continuación, en este caso es para dos pacientes.
- c. Retire el gel de la estufa y déjelo enfriar 1 ó 2 minutos.

Carril	Muestra
1	Proteína de unión ( referencia )
2	antisuero IgG
3	antisuero IgA
4	antisuero IgM
5	antisuero Kappa
6	antisuero Lambda
7	Proteína de unión ( referencia )
8	antisuero IgG
9	antisuero IgA
10	antisuero IgM
11	antisuero Kappa
12	antisuero Lambda

- d. Después de 10 minutos de difundir el antisuero, remueva cuidadosamente la placa. No incube con la placa.

**6. incubar los geles.**

- a. Remueva el gel del plato y póngalo sobre un recipiente seco en la incubadora, no lo cubra.
- b. Mantenga abierta la incubadora durante 20 minutos a 37 grados centígrados.
- c. Remueva el gel.

### **7. Seque los geles.**

- a. ponga el gel en un plato seco
- b. humedezca y presione el gel con un papel absorbente con 0.85% de NaCl
- c. Llene dos botes universales hasta el tope.
- d. Pase la placa del gel por el bote universal por 10 minutos.
- e. remueva el gel y sumerjalo pro 10 min en la solución de NaCl.
- f. Repita la operación
- g. Déjelo en el secador pro 2 minutos a 55 grados.

### **8. Tinción del gel.**

- a. Coloque el gel dentro de la primera solución de ácido acético al 5% y agite suavemente durante 1 minuto.
- b. Coloque el gel dentro de la segunda solución de ácido acético al 5% y agite suavemente durante 1 minuto ó hasta eliminar la humedad de la parte posterior del mismo.
- c. Coloque el gel dentro de la tercera solución de ácido acético al 5% y agite suavemente durante 1 minuto, o hasta eliminar el exceso de colorante.
- d. Remueva el gel y elimine la humedad de la parte posterior del mismo.
  
- e. Coloque el gel dentro de la estufa y séquelo por 2 minutos a 55°C ó hasta que seque.
- f. Interprete los resultados visualmente ó analícelo en su densitómetro a la longitud de onda recomendada.

RESULTADOS  
OBSERVACIONES  
CONCLUSIONES.

## **PRUEBA PARA SÍFILIS " V.D.R.L. Y P.R.R. "**

Estas pruebas se basan en la floculación de antígeno artificial-combinación de colesterol cubierto de lipoide, con o sin cardiolipina- en presencia de Ac del suero del paciente.

El antígeno artificial se estandariza mediante un ajuste del contenido de lectina, con objeto de obtener resultados reproducibles cualitativa y cuantitativamente. El colesterol proporciona los centros de absorción de forma que las partícula aglutinadas pueden visualizarse. Son pruebas de este tipo las de Hinton, Hanhn, Kline y del laboratorio de investigaciones de enfermedades venéreas ( Veneral Disease Research Laboratory, VDRL).(6)

La sífilis humana se transmite habitualmente por contacto sexual. En el varón los organismos patógenos se halla presentes en lesiones de pene o son descargados con e líquido seminal desde las vías genitourinarias. En la mujer, las lesiones infecciosas se localizan habitualmente en la región perineal, labios, pared vaginal o cérvix. El organismo penetra a través de las membranas mucosas, pero parece poder atravesar la piel por pequeñas excoriaciones, La multiplicación en el lugar de entrada causa, entre los 10 y 60 días, una lesión inflamatoria primaria, denominada chancro, que se transforma en una papula y se abre, formando una úlcera superficial de base dura y limpia. Las células inflamatorias predominantes en la sesión son linfocitos y células plasmáticas. Aunque el chancro cura espontáneamente, los organismos en su estadio precoz invaden los ganglios linfáticos regionales y eventualmente alcanzan la corriente sanguínea, produciendo una infección generalizada.(1)

De 2 a 12 semanas tras la aparición de la lesión primaria, suele observarse un exantema cutáneo generalizado, que a menudo afecta también las mucosas. Durante este período secundario generalizado de la enfermedad pueden aparecer lesiones en los ojos, huesos ,articulaciones o sistema nervioso central. Todas las lesiones secundarias, particularmente las de la membranas mucosas, contienen gran número de espiroquetas.(6)

No se sabe prácticamente nada acerca de los mecanismos que conducen a la destrucción de las miriadas de treponemas existentes en las lesiones primarias y secundarias. La inmovilización inmunológica, que es una reacción treponemicida o las respuestas de inmunidad celular tendrían un papel principal.(14)

## TÉCNICA.

### Material y Equipos

Placas de vidrio con anillos de cerámica que limitan superficies de 14 mm de diámetro.

Jeringa de 2 ml

Agujas hipodérmicas de calibre 18, sin puntas que suministran 60 gotas por ml.

Pipetas serológicas de 0.1 y 1.0 ml.

- \* Microscopio
- \* Incubadora para inactivar el suero
- \* Agitador rotatorio.

## REACTIVOS.

*Antígeno.* Es una solución con 0.3 por 100 de cardioplipina, 0.9 por 100 de colesterol, y 0.21 + - 0.01 por 100 de lectina. El antígeno se debe conservar a temperatura ambiente, y no mostrar precipitación.

### *Solución salina amortiguadora.*

Cloruro de sodio	10.0 g
Formol neutro	0.5 ml
Fosfato disódico hidratado	0.093 g
Fosfato monopotásico anhidro	0.17 g
Agua destilada	1000 ml.
Sueros testigo	

## METODOLOGÍA.

### Preparación del suero.

El suero se obtiene de sangre coagulada centrifugada y se inactiva durante 30 minutos a 56 °C en la incubadora. Si los sueros se conservan cuatro horas o más después de esta inactivación, es preciso inactivarlos otra vez a la misma temperatura durante diez minutos. Si se observan partículas en suspensión, se repite la centrifugación.

### PREPARACIÓN DE LA EMULSIÓN DE ANTÍGENO.

- 1.- Se ponen con una pipeta 0.4 ml de solución salina amortiguador en el fondo de un frasco redondo de 30 ml. con tapón de rosca.
- 2.- Con una pipeta terminal de 1.0 ml agregar gota a gota 0.5 ml directamente sobre la solución salina, mientras se hace girar el frasco sobre una superficie plana, empleando un tiempo de 6 segundos, La punta de la pipeta debe quedar en el tercio superior del frasco y no debe permitirse que la solución salina moje la pipeta.
- 3.- Soplar la última gota del antígeno. Continuar la rotación del frasco con otros 10 segundos más.
- 4.- Con una pipeta de 5.0 ml. agregar 4.1 ml de la solución salina amortiguada.
- 5.- Tapar el frasco y agitarlo vigorosamente durante 10 segundos.
- 6.- El antígeno está listo, y puede emplearse en las 24 horas siguientes.

### MÉTODO PARA LA PRUEBA CUALITATIVA DE VDRL EN PLACA.

- 1.- Con una pipeta, poner 0.05 ml del suero preparado en el interior de uno de los anillos del portaobjetos.
  - 2.- Agregar una gota de la emulsión de antígeno, cuidando de que la jeringa esté perfectamente horizontal de modo que el bisel de la aguja quede hacia abajo, es decir, la superficie de goteo debe ser completamente horizontal. Si se aumenta el ángulo en que se sostiene la jeringa la superficie de caída disminuye y por consiguiente el tamaño de la gota.
  - 3.- El portaobjetos se hace girar durante 4 minutos. Si la rotación se hace a mano, debe hacerse sobre una superficie plana, describiendo un círculo de 5 cm. De diámetro a razón de 120 r.p.m. Puede usarse también un agitador rotatorio ajustado a 180 r.p.m.
  - 4.- Leer los resultados inmediatamente bajo el microscopio a 100 aumentos ( objetivo 10X ). El antígeno se presenta como bacilos cortos. La agrupación de éstas partículas en grumos pequeños o grandes se interpreta como grados de positividad. Se recomiendan los siguientes términos para reportar: POSITIVO, DÉBILMENTE POSITIVO Y NEGATIVO.
  - 5.- Se deben incluir siempre sueros conocidos como testigos positivos, débilmente positivos y negativos.
- Todos los sueros débilmente positivos y positivos se deben diluir en forma seriada en proporciones de 1:2 , 1:4 y así sucesivamente y cada dilución del suero se prueba mediante el método VDRL en portaobjetos.

### *IDENTIFICACIÓN DE REGINAS RÁPIDAS ( P.R.R. ó RPR)*

La infección sifilitica produce dos tipos de anticuerpos, el reaginico inespecifico y los antitreponemas especificos, que se miden con las pruebas no treponémicas y treponémicas, respectivamente. Las pruebas treponémicas, al igual que las no treponémicas, son positivas en los individuos que sufren cualquier infección treponémica, como frambesia, más del pinto y sífilis endémica.(14)

Los anticuerpos no treponémicos que se producen en la sífilis contienen inmunoglobulinas IgG y IgM dirigidas contra un antígeno lipóide que resulta de la interacción de *T. pallidum* con los tejidos del huésped, y posiblemente contra un antígeno lipóide del propio *T.pallidum*

El término reagina es inapropiado, ya que el anticuerpo IgE que actúa en ciertos fenómenos alérgicos también se conoce como reagina y no guarda relación con la reagina que nos ocupa.

Las pruebas no treponémicas o de anticuerpos reagina más utilizadas son la prueba rápida de la reagina plasmática ( RPR ) que puede ser automatizada ( ART) y la prueba de laminilla VDRL. Otras pruebas no treponémicas que se utilizan menos son las de la reagina sérica sin calentamiento ( USR ) y la de selección de reagina ( RST ). En estas pruebas, el anticuerpo se descubre por floculación microscópica ( VDRL, USR ) o macroscópica ( RPR, RST ) de la suspensión del antígeno.(14)

La RPR suele ser más costosa que la VDRL, pero es más fácil de llevar a cabo y utiliza suero sin calentar, es la prueba de elección para el diagnóstico rápido.

Los reactivos para VDRL son más baratos, pero deben prepararse frescos diariamente aunque el desarrollo de las pruebas macroscópicas más simples ha provocado la sustitución de VDRL por RPR en muchos laboratorios, la primera sigue siendo el método estándar utilizado para líquido cefalorraquídeo.

Las pruebas RPR y VDRL son igualmente sensibles y pueden utilizarse para selección inicial o para estimación cuantitativa de anticuerpos séricos de reagina. Este título refleja la actividad de la enfermedad: puede observarse un aumento de la sífilis primaria; los títulos de VDRL generalmente alcanzan 1: 32 o más en la sífilis secundaria; una caída persistente del título después del tratamiento de la sífilis temprana indica esencialmente una respuesta adecuada al tratamiento. Los títulos de VDRL no corresponden directamente a los de RPR, y las pruebas cuantitativas seriadas ( para conocer la respuesta al tratamiento ) deben utilizar una misma técnica.(12)

TÉCNICA:

METODOLOGÍA

PRUEBA CUANTITATIVA

- 1.- Colocar una gota ( 0.05 ml ) de suero o plasma problema en uno de los círculos de la tarjeta.
- 2.- Extender la muestra en toda el área de círculo. Agitar suavemente el gotero de plástico con aguja roma y sujetar en posición vertical, dejar caer una gota del antígeno sobre la muestra del suero o plasma.
- 3.- Agitar suavemente el gotero de plástico con aguja roma No. 21 y sujetar en posición vertical; dejar caer una gota del antígeno sobre la muestra del suero o plasma.
- 4.- Colocar en el agitador rotatorio y poner en movimiento durante 4 min. Efectuar la lectura macroscópicamente oscilando suavemente la tarjeta con las manos y bajo una luz fuente.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

POSITIVO: Floculación visible por formación de pequeños o medianos a grandes agregados ( Floculación ligera, marcada e intensa ).

NEGATIVO: Suspensión uniforme sin floculación aparente.

PRUEBA CUANTITATIVA.

- 1.- Para cada suero problema colocar 0.05 ml. de solución salina isotónica en los círculos 2 al 5.
- 2.- Colocar 0.05 ml de suero problema en el círculo 1.
- 3.- Diluir el suero problema usando capilares con marca de 0.05 ml de la siguiente manera: llenar un capilar con suero problema hasta la marca ( 0.05 ml ); vaciar el contenido en la solución salina del círculo 2 llenar y vaciar varias veces sin formar burbujas. Transferir 0.05 ml de la mezcla del círculo 2 a la solución salina del círculo 3. Continuar con la misma operación hasta el círculo 5.
- 4.- Extender en todas las áreas de los círculos el espécimen diluido.
- 5.- Agitar suavemente el antígeno R:P.R. del gotero de plástico. Colocar en posición vertical una gota cada círculo.
- 6.- Colocar la tarjeta en el agitador rotatorio y poner en movimiento durante cuatro minutos. Efectuar la lectura.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Se reporta la última dilución en que se observa floculación incluyendo aquellas que sean débiles.

Círculo	Dilución
1	1 / 1
2	1 / 2
3	1 / 4
4	1 / 8
5	1 / 16

RESULTADOS.

OBSERVACIONES.

CONCLUSIONES

## **ANTIESTREPTOLISINAS EN SUERO**

La bacteria este formada por varias estructuras física y químicamente diferentes que varían en su capacidad inmunógena. Esto puede atribuirse a su estrecha similitud estructural con hialuronidatos que existen en tejidos animales, y puede ser reconocida como algo extraño por el huésped.(1)

Esta ausencia de capacidad inmunógena también puede explicar la virulencia del organismo. Las bacterias que están revestidas de anticuerpos se captan más fácilmente y destruyen por células fagocíticas. Los antígenos específicos del grupo ( A hasta N ) sonde naturaleza glúcida y también se descubren dentro de la pared celular del estreptococo. Los anticuerpos para estos carbohidratos no son protectores, pero permiten la clasificación de los estreptococos en grupos serológicos, pues fueron descritos primeramente por Lancefield. además, el estreptococo elabora productos extracelulares inmunógenos. Estos incluyen las toxinas eritrógenas, las estreptolisinas S y O y otras toxinas diversas.(1)

Los anticuerpos contra estas proteínas pueden tener función protectora ( por ejemplo antieritrógena en la escarlatina ) y también pueden tener utilidad para el diagnóstico de esta enfermedad ( por ejemplo antiestreptolisina ). Cuando se considera que cada uno de estos inmunógenos tiene cuando menos uno, y probablemente más determinantes antigénicos, el número de anticuerpos de especialidad diferente que puede producirse después de la inmunización o la ingestión pasa a ser muy elevado.(13)

Las estreptolisinas son las toxinas producidas por los estreptococos beta-hemolíticos del grupo A, son toxinas hemolíticas que se han denominado estreptolisina O y estreptolisina B. la infección con estreptococos del grupo A sensibiliza al paciente contra la estreptolisina O y estimula la producción de su correspondiente anticuerpo, la antiestreptolisina O.

El antígeno necesario para este método se obtiene a partir del caldo de un cultivo de 18 horas de estreptococo del grupo A, mezclado con diluciones del suero tamponado e incubado del paciente, a continuación se añade una suspensión al 5% de eritrocitos humanos del grupo O ó de conejo, y se reincuban los tubos. El punto final está constituido por la mayor dilución de suero que no produce hemólisis ( por ejemplo inactiva toda la estreptolisina ).(1)

**ESTREPTOLISINA + ANTIESTREPTOLISINA ----- Ag - Ac \***

- Ag -Ac + Glóbulos Rojos -----No hay lisis.

ESTREPTOLISINA + ANTIESTREPTOLISINA ----Ag -Ac \* +Ag no neutralizado

\* Ag -Ac no neutralizado + Glóbulos rojos ----- Si hay lisis.

**TÉCNICA :**

**Material y Equipo**

- 18 Tubos de ensaye de 13 X 100
- 3 Tubos de ensaye de 15 X 125
- 3 Pipetas Pasteur
- 3 Pipetas de 1.0 ml.
- 1 Pipetas de 10 ml.
- 1 Gradilla

**Reactivos**

**Solución Amortiguadora:** Se utiliza para diluir el suero y preparar la suspensión de glóbulos rojos al 5%. Se prepara disolviendo: 7.4 g de NaCl, 2.3g de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> y 1.81g de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> en 1000 ml. de agua destilada ajustando en pH a 6.5-6.7 con solución de NaOH 0.1 N.

**Suspensión de Glóbulos rojos.** Se lavan tres veces con solución salina isotópica glóbulos rojos humanos o de conejo, de una muestra fresca y desfibrinada, el lavado final se efectúa a 2000 r.p.m. durante 15 minutos, el sobrenadante deberá ser claro, de no ser así, indicaría que los eritrocitos están frágiles y no deben ser utilizados.

Preparar: 0.5 ml de paquete de eritrocitos lavados en 9.5 ml de solución amortiguadora.

**Dilución de suero:** Diluir el suero de la siguiente manera:

Dilución:

- 1 : 10      0.5 ml de suero con 4.5 ml de solución amortiguadora.
- 1 : 100     1.0 ml de la dilución 1:10 con 9.0 ml de solución amortiguadora.
- 1 : 500     2.0 ml de la dilución 1:100 con 8.0 ml de solución amortiguadora.

Con las diluciones anteriores se prepara el siguiente protocolo:

<b>DILUCIÓN</b>	<b>1 : 10</b>		<b>1 : 100</b>					<b>1: 500</b>						
<b>Tubo</b>	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>5</b>	<b>6</b>	<b>7</b>	<b>8</b>	<b>9</b>	<b>10</b>	<b>11</b>	<b>12</b>	<b>13</b>	<b>14</b>
Volúmen de la dilución en ml.	0.8	0.2	1.0	0.8	0.6	0.4	0.3	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0
Volúmen de la solución amortiguadora en ml.	0.2	0.8	0.0	0.2	0.4	0.6	0.7	0.0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.5	1.0
<b>AGITAR LOS TUBOS</b>														
Volúmen de estreptolisina HYL A en ml.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>AGITAR E INCUBAR A 37 °C DURANTE 15 MINUTOS</b>														
Volúmen de la suspensión de glóbulos rojos en ml.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<b>AGITAR E INCUBAR A 37°C DURANTE 45 MIN. AGITANDO LOS TUBOS CADA 15 MINUTOS CENTRIFUGAR LOS TUBOS DURANTE 1 MIN. A 1500 R.P.M.</b>														
Título en unidades Todd	12	50	100	125	166	250	333	500	625	833	1250	2500	--	--

**INTERPRETACIÓN**

El número de unidades de antiestreptolisinas expresadas en unidades TODD, será el último tubo de la dilución en el cual no hubo hemólisis. Por ejemplo un suero que no presenta hemólisis de los tubos 1 a 5, hemólisis parcial en el tubo 6 y hemólisis completa en todos los demás será reportado como 166 unidades todd.

**CONTROLES:**

NO HEMOLISIS: Tubo No. 13

HEMOLISIS TOTAL : Tubo No. 14

Generalmente, se considera que las cifras de 50 unidades Todd o menos significan que no existe infección por estreptococo; los resultados de 500 unidades o más son muy sugestivos de infección reciente y activa por estreptococo. Lo mejor es llevar a cabo dos pruebas con una semana de intervalo para ver si el título está aumentado o disminuyendo; una determinación única generalmente tiene un valor más limitado.

La prueba mide la cantidad de Ac producido como respuesta a al hemolisina O del estreptococo.

RESULTADOS

OBSERVACIONES

CONCLUSIONES:

## DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI HIV 1 Y 2 POR EL MÉTODO DE ELISA

Características Inmunitarias principales.

- Se infectan las células CD4 del sistema inmunitario, incluyendo, linfocitos T, monocitos, y macrófagos, células dendríticas foliculares y células de Langerhans.
- La infección causa defectos globales progresivos de la inmunidad humoral y mediada por células.
- Están disminuidos los linfocitos T tipo Cd4 ( cooperadores / inductores ).
- Existe activación policlonal de linfocitos B con disminución de la producción de inmunoglobulinas.
- La enfermedad progresa a pesar de respuestas vigorosa humoral y celular contra el virus.

La infección del HIV afecta de manea predominante al sistema inmunitario y el cerebro. La característica inmunitaria dominante de infección por HIV, es la depleción progresiva del subgrupo CD4 de los linfocitos T y por tanto revierte la proporción normal CD4 : CD8 y empeora la inmunodeficiencia. La depleción de los linfocitos DC4 se debe sobre todo al tropismo de HIV por estas y otras células que poseen CD4, porque la superficie de la molécula CD4 funciona como receptor para e virus.

El descubrimiento de que la molécula CD4 se encuentra en otras células diferentes de los linfocitos T cooperadores / inductores, se acompañó de que HIV podría infectar otras poblaciones celulares que expresaban esta molécula en su membrana. Otras células susceptibles de infección por HIV incluyen monocitos y macrófagos, células de microglia, células de Langerhans, células dendríticas, células B perpetuadas, células de retina y células de la mucosa del colon.

La posibilidad de que HIV sea capaz de infectar macrófagos ó linfocitos está determinada en gran parte por la secuencia de aminoacidos de la envoltura de HIV. La fijación de gp20 a Cd4 produce como resultado exposición de la proteína transmembranal, gp41, facilitando la fusión de los virus y la células y la penetración viral.

Tempranamente en la infección el virus por lo general no produce la citopatología característica de células gigantes multinucleadas o sincitios en los cultivos celulares y se describe como no inductera de sincitios. Un cambio en el fenotipo viral de no inductora de sincitios a inductora de sincitios se produce aproximadamente al mismo tiempo en que declina la cantidad de CD4 y el inicio de la enfermedad clínica relacionada con HIV.

La exposición de HIV no siempre resulta en infección. Sin embargo, una exposición puede ser suficiente para provocar infección dependiendo del tamaño del inoculo, vía de entrada y quizá factores del huesped. Casi el 50% de los individuos infectados con HIV contraerá el SIDA en un periodo de 8 a 10 años a partir del momento de infección. Ya que existe un periodo de latencia ( a partir del momento de infección hasta el inicio de la enfermedad) .

El patrón común de la respuesta serológica después de una infección por HIV. El antígeno P24 puede detectarse primero durante la fase de mononucleosis aguda por HIV. El anticuerpo inicial que aparece en el suero por lo general, esta dirigido contra la glucoproteína de envoltura gp120 y su valor permanece elevado durante todo el curso de la enfermedad. El anticuerpo dirigido contra la proteína central anti-p24 parece en el suero coincidente con la declinación de valores de antígeno p24.

La detección de HIV se hace principalmente por ELISA y las pruebas confirmatorias en caso de positividad son, mancha Western y radioinmunovaloración.

La prueba Inmunocomb II HIV 1 y 2 BiSpot consiste en un ensayo inmuno-enzimático indirecto de fase sólida (EIA). La fase sólida es un peine con 12 proyecciones ("dientes"). Cada diente está sensibilizado en tres áreas reactivas:

- ☆ Punto superior.- anticuerpos de cabra contra inmunoglobulina humana ( Control interno).
- ☆ Punto medio.- péptidos sintéticos de HIV-S
- ☆ Punto inferior.- péptidos sintéticos de HIV-1.

La bandeja de desarrollo tiene 6 filas (A-F) de pocillos. Cada fila contiene una solución reactiva lista para ser usada en cada etapa del ensayo. La prueba es realizada en etapas, pasando el peine de una fila a otra, con un período de incubación en cada etapa.(8)

Para comenzar la prueba, se agregan muestras de suero o plasma al diluyente en los pocillos de la fila A de la bandeja de desarrollo. Luego se inserta el peine en los pocillos de la fila A. Los anticuerpos anti-HIV, en caso de estar presentes en las muestras, se unen específicamente a los péptidos sintéticos, de los puntos inferior y medio de los peines.

Simultáneamente las inmunoglobulinas presentes en las muestras son capturadas por los anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulina humana del punto superior (control interno). Los componentes no unidos son removidos con un lavado en la fila B, el IgG capturado en los dientes reacciona con los anticuerpos antiIgG humana marcada con fosfatasa alcalina. En las dos filas siguientes, los componente no unidos son removidos con el lavado. En la fila F, la fosfatasa alcalina unida reacciona con componentes cromógenos. Los resultados son visibles como puntos de color azul grisáceos en la superficie del diente del peine.(8)

El kit incluye un control positivo (que contiene anticuerpos de HIV-1 y de HIV-2) y un control negativo, que debe incluirse cada vez que se realice la prueba. Al término de ésta, el diente usado con el control positivo deberá mostrar 3 puntos de color azul grisáceo y el diente usado con el control negativo deberá mostrar solamente el punto superior. Este punto también deberá aparecer en los demás dientes para confirmar que la muestra fue agregada, que el kit funciona apropiadamente y que la prueba fue realizada correctamente.

**REACTIVOS:**

Peines.- Cada peine tiene 12 dientes y cada diente es sensibilizado con tres áreas reactivas.

Punto superior.- Anticuerpos de cabra contra inmunoglobulina humana ( control interno).

Punto medio.- Péptidos sintéticos de HIV-2.

Punto inferior.- Péptidos sintéticos de HIV-1.

Bandejas de desarrollo.- Con desarrollo de 6 filas ( A- F) de 12 pocillos cada una. Los contenidos de cada fila son los siguientes:

Fila A: Diluyente de la muestra.

Fila B: Solución de lavado.

Fila C: Anticuerpo de cabra contra IgG humana marcados con fosfatasa alcalina.

Fila D: Solución de lavado.

Fila E: Solución de lavado.

Fila F: Solución de sustrato cromógeno conteniendo 5 -bromo-4-cloro -3Indolil fosfato (BCIP) y nitro azul tretrazolio (NBT).

**PRECAUCIONES:**

- ↗ Maneje el control positivo como si fuese potencialmente infeccioso, aunque haya sido inactivado.
- ↗ Use guantes quirúrgicos y ropas de laboratorio.
- ↗ No use la pipeta aspirando con la boca.
- ↗ Deseche todas las muestras, bandejas de desarrollo y otros materiales utilizados con el kit como desechos biocontaminantes.
- ↗ Todas las soluciones de referencia y todas las muestras humanas deben ser manejadas como si fueran potencialmente infecciosas.
- ↗ Almacene el kit en su caja original a temperatura de 2 a 8°.C
- ↗ No congele el Kit.

**MUESTRA:**

Es posible usar suero o plasma en la prueba. Las muestras pueden ser almacenadas por 7 días a temperaturas de 2°. A 8°. C antes de la prueba. Para almacenar las muestras por más de 7 Días congélelas a -20°. C o a temperaturas más bajas.

Después de descongelar las muestras de suero, centrifúguelas. Use el sobrenadante para la prueba.

## **TECNICA**

- La prueba debe realizarse a temperatura ambiente (22 - 26°C)
- Preparación de la bandeja de desarrollo.
- Incube la bandeja de desarrollo en incubadora a 37°C durante 20 minutos; o deje a temperaturas más ambiente (22 - 26°C) durante 3 horas.
- Cubra la mesa de trabajo con papel absorbente, para ser desechado como desecho biocontaminante al concluir la prueba.
- Mezcle los reactivos sacudiendo la bandeja de desarrollo.

### **NOTA:**

No retire la cubierta de aluminio de la bandeja de desarrollo; rómpala usando la punta desechable de la pipeta o el perforador, cuando las instrucciones de la prueba así lo indiquen.

### **PREPARACIÓN DEL PEINE:**

- Para asegurar el funcionamiento apropiado de la prueba, no toque los dientes del peine.
- Abra el empaque de aluminio por el borde perforado. Retire el peine.  
Es posible utilizar todo el peine y la bandeja de desarrollo o una parte. Para utilizarse parte del peine:
- Determine cuantas dientes va a utilizar para analizar las muestras los controles. Se necesita un diente para cada prueba.
- Doble y rompa verticalmente el peine, o córtelo con tijeras para separar el número requerido para las pruebas (número de pruebas incluidos dos controles).
- Vuelva a meter la porción no utilizada del peine en el empaque de aluminio ( con la bolsa desecante). Cierre bien el empaque ( con un clip) a fin de mantenerlo seco.
- Almacene el peine a temperatura de 2 a 8°C para su uso posterior.

## **INTRUCCIONES PARA LA PRUEBA.**

*Reacción Antígeno - Anticuerpo (fila A de la bandeja de desarrollo).*

- I. Tome 50 ml de la muestra con la pipeta. Perfore con la punta de la pipeta o el perforador la cubierta de papel de aluminio de un pocillo en la fila A de la bandeja de desarrollo y vierta la muestra en el fondo del pocillo. Mezcle vaciando y rellenando repetidamente la solución con la pipeta. Deseche la punta de la pipeta.

I. Repita el paso (1) para las demás muestras incluyendo un control positivo y uno negativo provistos en el kit. Use un nuevo pocillo en la fila A para cada muestra o control. Cambie las puntas de las pipetas para cada muestra.

A). Inserte el peine (con el lado impreso hacia usted) en los pocillos de la fila A que contienen las muestras y los controles. Mezcle: Retire e inserte el peine en los pocillos varias veces.

B). Deje el peine en la fila A durante exactamente 10 minutos. Active el cronómetro. Hacia el final de los 10 minutos, perforo el papel aluminio en la fila B usando el perforador. No habrá más pocillos de los necesarios.

C). Al cumplirse los 10 minutos, saque el peine de la fila A. Absorba el líquido adherido a las puntas de los dientes apoyándolos sobre un papel absorbente limpio. No toque la superficie frontal del diente.

Primer lavado (fila B):

II. Inserte el peine en los pocillos de la fila B. Agite: inserte y retire vigorosamente el peine en los pocillos durante al menos 10 segundos para que quede bien lavado. Repita el lavado varias veces agitando en el transcurso de 2 minutos; mientras tanto, perforo el papel aluminio de la fila C. Después de 2 minutos, retire el peine para que absorba el líquido adherido como en el paso (3C). Unión del conjugado (Fila C).

III. Inserte el peine en los pocillos de la fila C. Mezcle igual que en el paso ( A ). Programe el cronómetro para 10 minutos. Perforo el papel aluminio de la fila D. Después de 10 minutos, retire el peine y absorba el líquido adherido

IV. Inserte el peine en los pocillos de la fila D. Agite igual que en el paso (4). Espere 2 minutos; mientras tanto perforo el papel aluminio en la fila E. Después de 2 minutos, retire el peine y absorba el líquido adherido.

### **TERCER LAVADO (FILA E).**

I. Inserte el peine en los pocillos de la fila E. Agite. Espere 2 minutos; mientras tanto perforo el papel aluminio de la fila F. Después de 2 minutos, retire el peine y absorba el líquido adherido.

### **REACCIÓN DE COLOR (FILA F).**

I. Inserte el peine en los pocillos de la fila F. Mezcle. Programe el cronómetro para 10 minutos. Después de 10 minutos retire el peine.

### **DETENCIÓN DE LA REACCIÓN (FILA E).**

II. Inserte de nuevo el peine en la fila E. Después de 1 minuto, retire el peine y déjelo secar al aire. Deseche las bandejas de desarrollo usadas, las puntas de las pipetas, el papel absorbente y los guantes como desechos biocontaminantes.

***Almacenamiento de partes no usadas del kit:***

Bandejas de desarrollo: Si no usó todos los pocillos de la bandeja de desarrollo puede almacenarla para ser usada posteriormente: selle los pocillos usados con cinta adhesiva ancha a fin de que nada se derrame fuera de los pocillos, incluso en caso de que la bandeja de desarrollo sea volcada.

***Otros materiales del kit:***

Vuelva a colocar las bandejas de desarrollo, peines, perforador, controles e instrucciones den la caja original del kit y almacene a temperatura de 2 a 8° C.

***Resultados de la prueba:***

***Validación.***

A fin de comprobar el funcionamiento correcto de la prueba y demostrar que los resultados son válidos, deben cumplirse las siguientes 3 condiciones:

- I. El control positivo debe producir 3 puntos en el diente del peine.
- II. El control negativo debe producir un punto superior (control interno) y no otros puntos.
- III. Cada muestra analizada debe producir un punto superior (control interno). Esto también confirma que la muestra ha sido agregada.

Si cualquiera de estas 3 condiciones no se cumplen, los resultados de la prueba no son válidos y las muestras y controles deben ser reexaminados.

***INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:***

La presencia explosiva del punto superior ( control interno 9 indica que la muestra no reacciona a los anticuerpos contra HIV-1 y HIV-2.

Un punto medio circular, de color uniforme, indica la presencia de anticuerpos contra HIV-2.

Un punto inferior circular, de color uniforme, indica la presencia de anticuerpos contra HIV-1.

Dada la estrecha similitud entre HIV-1 y HIV-2, existe la posibilidad de reactividad cruzada de anticuerpos, misma que podría generar positividad en ambos puntos de reacción. Sin embargo, en éste caso debe compararse la intensidad de los 2 puntos, el de mayor intensidad indica el tiempo de HIV, sólo en caso de que la intensidad se idéntica en ambos puntos, puede considerarse co-infección por HIV-1 y HIV-2.

**IMPORTANTE.**

La presencia de anticuerpos contra HIV-1 o HIV-2 en las muestras analizadas debe ser confirmada con una prueba confirmatoria.

Cualquier coloración débil en el diente debe ser considerada sospechosa de representar una reacción positiva y debe ser reanalizada.

**ARCHIVO DE RESULTADOS**

Debido a que el color que aparece en el peine es estable, es posible archivar los peines para consulta posterior.

**LIMITACIONES**

Este kit es una prueba de tamizaje. La reactividad de los anticuerpos contra HIV-1 / HIV-2 no debe ser considerada como un diagnóstico del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) o de la infección por HIV. Debido a que la producción de anticuerpos contra HIV, después del contacto inicial puede ser tardía, un resultado negativo en esta prueba no debe ser considerada como evidencia concluyente de que el paciente no ha sido expuesto ni se ha infectado con HIV.

Para confirmar debe efectuarse alguna prueba como Western Blot.

RESULTADOS  
OBSERVACIONES  
CONCLUSIONES

## **DETERMINACIÓN DE ANA POR INMUNOFLOURESCENCIA INDIRECTA**

Los laboratorios han utilizado procedimientos de anticuerpo fluorescentes indirectos para detectar anticuerpos desde 1957. En esos procedimientos, un anticuerpo fluorescente sirve como marcador para una reacción ligada antígeno-anticuerpo, la cual ocurre en la superficie del sustrato. Entre los sustratos comúnmente usados en el procedimiento IFA (anticuerpos inmunofluorescentes) están el riñón y estómago de ratón, células humanas epiteliales y *Crithidia luciliae*, un hemoflagelado. La observación de un patrón específico de fluorescencia en el sustrato indica la presencia de autoanticuerpos en el suero del paciente.

Los autoanticuerpos en una muestra de análisis se unen a los antígenos homólogos en el sustrato. El lavado quita el exceso de suero del sustrato. El antisuero fluorescente conjugado agregado al sustrato se une al autoanticuerpo ligado. Después de un segundo lavado para quitar el exceso de conjugado, el sustrato es cubierto, deslizado y observado para detectar patrones fluorescentes, en un microscopio fluorescente. La observación de un patrón fluorescente específico en el sustrato indica la presencia de autoanticuerpos en la muestra de análisis.(12)

Un resultado positivo de ANA (anticuerpos antinucleares) positivo generalmente ocurre en una cantidad de desórdenes autoinmunes tales como lupus eritematoso sistémico, enfermedad del tejido conjuntivo mixto, artritis reumatoidea, síndrome de Sjögren, y esclerosis sistémica progresiva. De todas maneras, la incidencia de títulos bajos de ANA, positivos aumento con la edad en sujetos normales.

### **TECNICA.**

#### **MATERIAL.**

- Portaobjetos con sustrato.
- Control positivo
- Control negativo
- Conjugante FITC universal
- medio de montaje
- Buffer salino de fosfato
- Contraste de azul de Evans
- Tiras de papel filtro.
- Micropipetas Pasteur para 25µl
- tubos de ensayo de cristal de 12 x 75 ó de 13 X 100
- Cámara húmeda
- Recipiente para lavar los portas

Agitador magnético  
Botella de plástico para lavado  
Cubetas, 24 X 60 mm.  
Agua destilada  
Microscopio de fluorescencia.

PROCEDIMIENTO.

Reconstruir los controles liofilizados y el PBS con agua destilada.  
Preparar la dilución apropiada para el screening del suero.  
Mezclar por inversión. Cada laboratorio debe establecer una dilución de screening o muestreo basado en rangos de normalidad según la edad.

HEp2	1:40 ( 1 parte suero paciente+ 39 partes de PBS )
------	---

Sacar el número necesario de portaobjetos del congelador y dejarlo a la temperatura ambiente dentro de la bolsita de estaño ( 20min ).

Equilibrar todos los reactivos a temperatura ambiente.

Sacar los portaobjetos de la bolsas y ponerlos en la cámara húmeda.

Inmediatamente añadir 25µl de los controles ó de los sueros diluidos a los pocillos correspondientes.

Tapar la cámara húmeda / cámara de incubación. Incubar los portaobjetos a temperatura ambiente durante 20 min. PRECAUCIÓN: EVITE MOVER LA CÁMARA DE INCUBACIÓN.

Lavar cada portaobjetos suavemente con un chorro de PBS. Aplicarlo sobre los pocillos de forma que el PBS lave sobre cada pocillo, pero sin dañarlos.

Secar cada porta o soporte y secar el exceso de PBS, alrededor de los pocillos utilizando las tiras de papel filtro. Evitar tocar con las mismas el substrato.

Poner los portaobjetos en la cámara húmeda e inmediatamente añadir 1 gota de conjugado FITC, a cada pocillo.

Tapar la cámara húmeda/ cámara de incubación. Incubar durante 20 min. a la temperatura ambiente.

Lavar cada porta suavemente con un chorro de PBS

Lavar los portaobjetos durante 10 min. en un excipiente con PBS, u opcionalmente procedimiento de contraste. Añadir el contraste de azul de evans al PBS en un recipiente y lavar los portaobjetos durante 10min.

Secar cada portaobjetos o soporte de PBS y secarlo con un papel secante.

Observar al microscopio.

## INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS.

Si no se observa un patrón específico de fluorescencia en el substrato el análisis para ANA es negativo.

El análisis para ANA es positivo cuando el substrato muestra un patrón específico de fluorescencia.

### PATRON HOMOGENEEO ( DIFUSO)

El núcleo se tiñe en forma pareja en todas partes. Dentro de las células mitóticas los cromosomas se tiñen en una masa de forma irregular con los bordes externos mas intensamente teñidos. Esta combinación de patrones sugiere autoanticuerpos a nDNA, histonas o DNP.

### PATRON BORDE ( PERIFERICO)

El núcleo se tiñe predominantemente en la periferia. Dentro de las células mitóticas, los cromosomas se pueden teñir en una masa de forma irregular con los bordes externos mas intensamente teñidos. Esta combinación de patrones sugiere autoanticuerpos a los complejos nDNA o DNA-histonas. Si los cromosomas de las células mitóticas son negativos, el patrón nuclear del borde puede sugerir autoanticuerpos a membrana nuclear y no a nDNA.

**PATRON MOTEADO.** Patrones moteados 1) y 2) sugieren anticuerpos a Sm; RNP, Scl-70, SSA, SSB, otros antígenos indefinidos.

**1.MOTEADO FINO.** Numerosos puntos pequeños uniformes de fluorescencia diseminados a través del núcleo con márgenes nucleares claros. Los nucléolos aparecen como fragmentos no teñidos en el núcleo moteado. Unas pocas motas gruesas pueden estar dispersas entre las motas finas. El citoplasma de la célula mitótica puede retener motas finas, mientras que los cromosomas de las células mitóticas son negativos.

**MOTEADO GRUESO O ATIPICO.** Puntos uniformes de fluorescencia de tamaño mediano dispersos a través del núcleo con márgenes nucleares claros. Los cromosomas de las células mitóticas son negativos. Infrecuentemente, motas mas grandes pueden estar también presentes las que dan la apariencia de un patrón nucleolar positivo excepto que son demasiado numerosos y varían en tamaño.

**MOTEADO SEPARADO ( ESPECIFICIDAD CENTROMERE)** Puntos uniformes de fluorescencia de tamaño mediano dispersos a través del núcleo con márgenes nucleares borrosos. En las células mitóticas las motas separadas están aglomeradas solo en la masa de cromosomas.

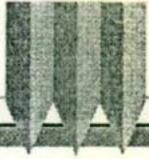
Durante la etapa profase de la mitosis, la aglomeración de motas aparece como una nube sobre la masa entera de cromosomas. Durante la metafase y anafase. las motas se localizan en los cromosomas y pueden aparecer en forma de barras mas definidas. La especificidad del patrón moteado separado es hacia el centromero y es altamente correlacionado con el síndrome de CREST, esclerosis sistémica progresiva.

**PATRON NUCLEOLAR.** Teñido intenso y homogéneo de los nucléolos a menudo relacionado con fluorescencia homogénea débil del resto del núcleo. Los cromosomas de las células mitóticas son a menudo negativos, sin embargo algunos anticuerpos nucleolares pueden reaccionar con los cromosomas. Las células mitóticas no poseen nucleolos claros.

**PATRON HUSO.** En las células experimentando mitosis solo el huso fluoresce. El huso consiste en una red de filamentos que se originan en los centrómeros y que conectan los centrómeros entre sí.

**PATRON MITOCONTRIAL.** Un análisis positivo de AMA es sugerido cuando numerosas motas citoplasmáticas aparecen principalmente en el citoplasma de células interfase y mitóticas. Un número limitado de gránulos fluorescentes pueden estar presentes a través de la superficie del núcleo

RESULTADOS  
OBSERVACIONES  
CONCLUSIONES.



# **PRACTICAS COMPLEMENTARIAS**

## **PREPARACIÓN DE UNA VACUNA CONSTITUIDA POR BACTERIAS MUERTAS: VACUNA TIFICA.**

Definición; es una suspensión en solución salina isotónica que contiene 1,000 millones de gérmenes por mililitro de Salmonella typhi, muertos por calentamiento a 56°C durante una hora, adicionada del 0.5% de fenol como conservador.

Material necesario:

Cepa de Salmonella typhi 58.

- 1 Tubo de 22 \* 180 mm con gelosa inclinada.
- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 ml contenido 100 ml de gelosa
- 1 Fcos. De Roux de 1,000 contenido 200 - 250 ml de gelosa.
- 2 Placas de gelosa en cajas de Petri de 12 \* 100 mm

Solución salina isotónica estéril, 10 ml.

Solución al 5% de fenol, 2000 ml.

Solución salina isotónica fenolada al 0.5%, estéril ml. contenida en un matraz redondo de fondo plano de 1,000 ml.

- 1 Aditamento para repartir inóculo ( 1 ), estéril
- 1 Aditamento para partir solución salina isotónica fenolada (2), est.
- 1 Fco. De centrifuga de 250 ml con sistema de aspiración y filtro de gasa (3) estéril.
- 1 Fco. Con aditamento para aspirar el sobrante ( 4 ), estéril.
- 1 Matraz Erlenmeyer de 500 ml con graduación, estéril.
- 5 frascos tipo " vial " de 30 ml con tapón de hule, perforable, ests.
- 2 Fcos. Pyrex con tapón esmerilado, de 150 ml, uno de ellos estéril.
- 1 tubo de ensayo de 16 \* 150 mm.
- 1 Pipeta de 25 ml, dividida en 1/10, estéril
- 2 Pipetas de 10 ml, divididas en 1/10, estériles
- 2 Pipetas de 1 ml, divididas en 1/10 ml, estériles.
- 1 Tapón de hule del No. 6, estéril
- 1 Tapón de No. 2 horadado
- 1 Portaobjetos
- 1 Asa de platino de portatas
- Pinzas de Mohor.

Juego de colorantes para el Gram

Buldo de hule Termómetro de 0 - 100°C

Soporte con pinzas para bureta.

Centrifuga con cabezal para frascos de 250 ml

Nefelómetro

Baño de agua ajustado a 56°. C

Mechero

2 Charolas de peltre para desechar material contaminado para su posterior esterilización, o bien charolas de plástico llenas con solución de fenol al 5% el material contaminado deberá permanecer en esta solución un mínimo de 12 horas.

*Preparación de las semillas:*

- 1) Sembrar el tubo con gelosa inclinada con un inóculo grande de la cepa de S. typhi 58, extendiendo con el asa el inóculo perfectamente en toda la superficie del medio. Incubar 18 horas a 37°.C
- 2) Adicionar al tubo con el cultivo de S. typhi aproximadamente 6 ml de solución salina isotónica estéril, mediante una pipeta de 10 ml estéril con un bulbo de hule adaptado, expeliendo y absorbiendo la solución repetidas veces desprender el desarrollo bacteriano y pasarlo al matraz Erlenmeyer de 500 ml que contiene 100 ml de gelosa.
- 3) Extender el inóculo perfectamente por toda la superficie del medio y colocarlo en la estufa a 37°.C durante 18 - 24 hs.

**Siembra:**

- 4) Adicionar al matraz aproximadamente 40 ml de solución salina isotónica estéril y agitar suavemente para desprender completamente el desarrollo bacteriano, substituir la torunda de algodón por el aditamento para repartir inóculo, cerrar la pinza de la campana e invertir el matraz cuidadosamente para que no penetre líquido al filtro de aire. ( 1 )
- 5) Fijar el matraz con el inóculo a la altura adecuada, para que la campana quede dentro de la zona estéril del mechero, en el soporte monte las pinzas de soporte, cubrir la zona que queda bajo la campana de la mesa de trabajo con algodón impregnándolo con fenol al 5%, esto tiene por objeto que si accidentalmente gotea la suspensión de la pipeta de la campana, estas gotas caigan directamente en el algodón empapado con fenol.
- 6) Flamear la boca de un frasco de Roux, introducirlo en la pipeta de la campana y dejar la pinza libre a manera que fluyan unos 10 ml del inóculo, volver a flamear la boca del frasco de Roux, taparlo y extender el inóculo perfectamente en toda la superficie del medio, repetir esta maniobra con los dos frascos de Roux restantes.

- 7) Incubar los frascos a 37°C durante 24 - 30 hs., hasta que se observe que toda la superficie del medio está cubierta con desarrollo bacteriano.

Prueba de Pureza:

- 8) En un portaobjetos dividido en tres secciones, mediante marcas con lápiz graso, colocar en cada una, una gota de solución salina isotónica estéril, flamear el asa del platino, dejarla enfriar y tomar una muestra del primer frasco de Roux, extenderla dentro de una gota de solución salina isotónica a manera que el frotis, no quede ni muy grueso ni muy delgado, flamear nuevamente el asa, repetir esta maniobra con los otros dos frascos de Roux.
- 9) Dejar secar las frotis a la flama del mechero, teñirlos por el método de Gram y observar con objetivo de inmersión. Los cultivos deben ser de exclusivamente bacilos Gram negativos, si se observa cualquier otro tipo de microorganismos las siembras se desecharán y se volverá a comenzar la técnica.

Cosecha.

- 10) Adicionar a cada frasco de 10 a 15 ml de solución salina isotónica fenclada al 0.5 %, esta solución deberá estar contenida en un matraz redondo de fondo plano, de 1,000 ml con el aditamento especial para repartir esta solución. ( 2 ).
- 11) Agitando suavemente para no romper la placa de agar, se desprende completamente el desarrollo bacteriano y la suspensión se recoge en un frasco de centrifuga de 250 ml que lleva un tapón bihoradado, con dos conexiones; una a una pipeta de succión y la otra a la línea de vacío, como la pipeta de succión termina dentro del frasco en un filtro de gasa, en éste quedan retenidos los trozos de medio que se hubiera desprendido de la placa y los acúmulos de bacterias.
- 12) Substituir el tapón con el aditamento de succión por un tapón de hule del No. 6 estéril. El ditamento de succión se coloca en una charola de peltre para su inmediata esterilización ya que está contaminado con gérmenes vivos y virulentos, así mismo los frascos de Roux deberán esterilizarse antes de lavarlas por el mismo motivo.

- 13) Centrifugar a 3000 rpm durante 60 minutos. Mediante el aparato de succión ( 4 ) decantar el sobrenadante hasta el máximo posible. Éste frasco de succión debe contener solución de fenol al 5% y además se esterilizará porque está contaminado también con gérmenes virulentos.
- 14) Adicionar al sedimento 25 ml de solución salina isotónica fenolada al 0.5% y agitar para desprender completamente el paquete celular, esto se facilita con las perlas de vidrio que contiene el frasco de centrifuga.
- 15) Mediante una pipeta de 25ml dividida en 1/10 estéril, con un bulbo de hule adaptado, transferir la suspensión bacteriana a un frasco Pyrex con tapón esmerilado, estéril de 150 ml esta pipeta se debe colocar en una charola de peltre para su esterilización inmediata.

Determinación del Contenido de Gérmenes presentes en la suspensión:

- 16) Con una pipeta de 1.0, dividida en 1/10, estéril con un bulbo de hule adaptado, tomar 0.5 ml de la suspensión bacteriana y colocarlos en un tubo de ensayo de 16 \* 150 mm y agregar 19.5 ml de solución salina isotónica estéril, tapar el tubo con un tapón de hule y mezclar perfectamente.
- 17) Pasar aproximadamente 5 ml de esta suspensión diluida a una celdilla del nefelómetro y leer el grado de opacidad utilizando como blanco solución salina isotónica. Buscar en la curva de calibración del aparato la concentración que corresponde a la lectura obtenida y multiplicar por 40 éste valor, ya que esta fue la dilución que se hizo en el paso anterior de esta técnica. Éste dato es necesario para calcular la forma en que se hará la dilución final de la vacuna.

Regresar la suspensión diluída al tubo en que se realizó la dilución para su inmediata esterilización. La celdilla del nefelómetro está también contaminada y para su esterilización se sumerge completamente en una solución de fenol al 5% y se deja allí un mínimo de 24 hs. Para su esterilización antes de volver a manipularla.

Inactivación.

- 19) Para destruir la viabilidad de los gérmenes sin alterar su composición antigénica, la suspensión se coloca en un baño de agua regulado a 56°C y se deja a esta temperatura durante 60 minutos. El control de la temperatura se hace colocando en el baño junto al frasco que contiene la suspensión otro frasco Pyrex de 150 ml que se llena de solución

salina isotónica hasta un nivel igual al de un tapón esmerilado se substituye por un tapón de hule horadado del No. 2 en el que se inserta un termómetro de 0 a 100°C, de esta manera en una forma indirecta el control de la temperatura se hace en la zona interna del frasco. Los 60 minutos de calentamiento comienza a contarse desde el momento en el que se el termómetro marca 56° C. Durante este tiempo el frasco se agita de vez en cuando.

#### Prueba de viabilidad

20) Para comprobar si los gérmenes afectivamente están inactivados es decir, muertos, se toma una muestra de 1.0 ml con una pipeta estéril y se siembra en un placa de gelosa, la prueba se hace por duplicado. La placas se incuban durante 48 hs. A 37°C, si los gérmenes están ya inactivados al cabo de éste tiempo las placas no mostrarán ningún desarrollo, pero en caso contrario se obtendrá desarrollo de colonias de Salmonella typhi, de color blanco lisas y brillantes. Si los gérmenes están todavía vivos se calienta la suspensión durante 30 minutos más a 56°C y se repite la prueba de viabilidad. La prueba es satisfactoria cuando no se obtiene ningún desarrollo.

#### Dilución final de la vacuna:

21) Con el dato obtenido en la cuenta nefelométrica se calculará la cantidad de solución salina isotónica fenolada al 0.5 % que hay que agregar a la suspensión concentrada para tener la concentración final que es de  $10^9$  gérmenes por ml, para esto se aplica la siguiente fórmula matemática.

$\frac{\text{Cantidad que se tiene}}{\text{Cantidad que se desea}} - 1 = \text{Volumen de solución salina que deberá agregarse al volumen se susp. Concentrada.}$

Ejem: Si se tienen en la susp. Concentrada 36,250:000 000/ml

$$\frac{36,250:000,000}{1,000:000,000} - 1 = 35.25 \text{ ml}$$

Es decir, que por cada ml de la suspensión concentrada hay que agregar 35.25 ml de solución salina isotónica fenolada al 0.5% para tener como concentración mil millones de gérmenes por ml.

Esta dilución final se hará en un matraz redondo de fondo plano de 1,000 ml y así estará lista para los controles antes del envase y que son las pruebas de esterilidad, seguridad, potencia y sus controles químicos. En el presente ejercicio por falta de espacio en los refrigeradores se procederá a envasar en 5 frascos tipo "vial" de 30 ml con tapón de hule perforable estériles. Éste envase se hace con el aditamento que antes se utilizó para repartir solución salina isotónica fenolada ( 2 ) y ya envasada se harán las pruebas de control .

## **PREPARACIÓN DE UNA AUTOVACUNA BACTERIANA.**

Con cierta frecuencia se solicita a los laboratorios bacteriológicos la preparación de una autovacuna, especialmente cuando el tratamiento con antibióticos ha fracasado y se busca entonces obtener una respuesta del organismo infectado, desde el punto de vista inmunológico, es de esperarse que el germen vivo, infectante y virulento, produzca un estímulo antigénico más efectivo, sin embargo generalmente se obtienen buenos resultados al aplicar las autovacunas, probablemente se trate únicamente de la reacción del organismo al introducirle una sustancia extraña a manera de una proteinoterapia, las vacunas de este tipo se emplean con mayor frecuencia en casos de ostiomielitis y acné.

### TECNICA

#### MATERIAL:

- ◇ 6 tubos con medio de infusión de cerebro-corazón agar inclinado.
- ◇ 2 tubos con medio de tioglicolato fluido
- ◇ 2 tubos con medio de Saburau
- ◇ 50 ml. son solución salina isotónica estéril
- ◇ 1 ml. de solución de mercuritiosalicilato de sodio al 10%
- Colorantes de Gram.
  
- ◇ 2 ratones blancos de 18 a 20 gr. de peso.
- ◇ 1 matraz Erlenmeyer de 100 ml de capacidad con embudo de 6 cm. De diámetro conteniendo 4 capas de gasa, estériles y un tapón con algodón y gasa para el mismo.
- ◇ 3 pipetas de 10 ml. graduadas en 1 ml. y en 1/10 ml. estériles.
- ◇ 3 pipetas de 1 ml. graduadas en 1/10 ml. estériles.
- ◇ 1 jeringa hipodérmica de 2 ml. estéril
- ◇ 1 aguja hipodérmica no. 23 de 1 - 1/12 estéril
- ◇ Incubadora a 37°C
- ◇ Fotocolorímetro
- ◇ Microscopio
- ◇ Baño de agua regulado a 55 - 60°C
- ◇ Frasco de 30 ml. con tapón de hule perforable estéril.

## TECNICA

### TOMA DE LA MUESTRA:

Siempre que esto sea posible, se procurará tener la toma de la muestra de un absceso cerrado, para evitar la presencia de gérmenes contaminantes. El primer paso consistirá en hacer la asepsia del sitio donde se va a tomar la muestra y en caso de ser un absceso cerrado, se drenará si se trata de una lesión abierta, la toma de la muestra se realizará en la zona más profunda del absceso que sea accesible.

### METODOLOGÍA.

1. Utilizando un medio de cultivo rico; por ejemplo infusión de cerebro-corazón o bien gelosa-sangre, se siembra la muestra tomada del absceso. Se incuba de 24 a 45 hs. A 37°C, al cabo de éste tiempo se hace un frotis que se tiñe por Gram para determinar la morfología y características tintoriales del ó de los gérmenes infestantes.
2. Con el desarrollo obtenido en el tubo anterior se siembran otros cinco tubo del mismo medio procurando que el inóculo sea denso y que el asa de platino recorra toda la superficie del medio con objeto de obtener un desarrollo abundante. Se incuba en las mismas condiciones hasta tener un buen desarrollo, generalmente de 24 a 48 horas.
3. A cada tubo con desarrollo bacteriano se le adiciona aproximadamente 3.0 ml. de solución salina isotónica estéril, esta cantidad depende la abundancia del desarrollo obtenido, si éste es escaso, volúmen será menor.
4. Se agitan cuidadosamente los tubos para desprender el desarrollo que se recoge con una pipeta de 10 ml, estéril. La suspensión obtenida se filtra en el embudo a través de las capa de gas. Se retira el embudo del matraz y éste se tapa con un tapón de algodón y gasa estéril.
5. Se toma un muestra de exactamente 1.0 ml. de la suspensión y se coloca en una celdilla del fotocolorímetro, se adiciona 9.0 ml de solución salina isotónica y se lee el % de transmisión para determinar la concentración de gérmenes y se anota éste dato, ya posteriormente se calculará la cantidad de solución salina isotónica que deberá adicionarse para tener una concentración final de 1,000 gérmenes por ml.

6. Se coloca el matraz en un baño de agua a 56 - 60°C durante 60 minutos agitando de vez en cuando. Éste calentamiento tiene por objeto destruir la vialidad de los gérmenes sin alterar su composición antigénica, por esto es importante regular cuidadosamente la temperatura del baño.
  
7. Al terminar el periodo de calentamiento, tomar una muestra de 0.5 ml. de las suspensión y se siembra en un tubo con el mismo medio en que se cultivó inicialmente y se incuba en las mismas condiciones durante 72 horas para cersiorarse de que no quedan bacterias viva. En caso de que se obtenga desarrollo, se dará otro periodo de calentamiento y se realizará nuevamente la prueba de viabilidad.
  
8. Medir el volumen que se tiene de la suspensión de gérmenes y adicionar la cantidad de solución de etilmercuritiosalicilato de sodio al 10% para tener una concentración final de 1:1000 del conservador.

#### CONTROLES BIOLÓGICOS DE LA VACUNA TERMINADA.

##### PRUEBA DE ESTERILIDAD:

1. Tomar 4.0 ml de la vacuna terminada y sembrar 0.5 ml. en cada uno de los tubos con medio de tioglicolato fluído y dos tubos con medio Saburau.
  
2. Incubar los tubos con medio de tioglicolato fluído a 37°C durante 7 días y los tubos con medio Saburaund a temperatura ambiente por un periodo igual. Si la vacuna está estéril no aparecerá ningún desarrollo en los cuatro tubos y la prueba se considera satisfactoria.

##### PRUEBA DE SEGURIDAD

1. Inyectar 0.1 ml de la vacuna por via intramuscular a 2 ratones blancos de 18 a 20 gr. de peso. Estos animales se tienen en observación durante 7 días, no deberá producirle abceso en el sitio de la inoculación ni mucho menos presentar ningún síntoma de estar infectado o morir. Cuando la vacuna ha pasado satisfactoriamente estas pruebas se procede a envasarla en frascos estériles con tapón de hule perforable y se conserva entre 2 y 10°C

La dosis que se utiliza es generalmente de 0.1 ml. y se aplica por vía intradérmica.

Germen indentificado \_\_\_\_\_

Prueba de seguridad \_\_\_\_\_

Prueba de esterilidad \_\_\_\_\_

## **DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DEL COMPLEMENTO TOTAL 50% HEMOLITICO.**

El "Complemento" es un sistema de 9 factores denominados numéricamente C12345678 y 9. Todos ellos no parte del suero normal en una forma inactiva. Característicamente, una reacción antígeno - anticuerpo es capaz de activar al primer componente (C1) y desencadenar una secuencia de reacciones que van consumiendo uno a uno los diferentes componentes del sistema en el orden siguiente: C12345678 y 9 . La "activación" del complemento le confiere distintas funciones biológicas a los diferentes componentes.

Si el complejo antígeno - anticuerpo que activa el complemento se encuentra sobre una célula o si el antígeno forma parte de la membrana de ésta, entonces a final de la interacción de los 9 componentes ocurre una lisis de esa célula por lesión de su membrana.

Éste efecto citolítico del complemento se ha utilizado para determinar su concentración en el suero.

Clásicamente: se utiliza un sistema antígeno - anticuerpo donde el antígeno está en la membrana de glóbulos rojos de carnero (E) y los anticuerpos son hemolisinas (A) contra dichas células. Al incubar a 37°C E + A, se forman complejos EA o sea glóbulos rojos sensibilizados. Volúmenes iguales de éste sistema (EA) se reparten en una serie de tubos a los cuales se agregan diferentes volúmenes del suero cuya concentración de complemento se quiere determinar.

Bajo condiciones especiales de pH y de temperatura y en presencia de iones calcio y magnesio; el complejo EA activa en una secuencia los 9 componentes del complemento; los últimos componente se fijan sobre la membrana de los glóbulos rojos y determinan la lisis de estas células.

### **MATERIAL.**

1. - E: Sangre de carnero, conservada estéril en solución de Alsever ( 1)
2. A: Solución de hemolisina, de título conocido.
3. TBS: Solución amortiguadora, pH 7.3 - 7.4 (Buffer de trietanol amina-salina) (2).
4. Suero de cobayo, cuya concentración de complemento se quiere determinar

METODOLOGÍA.

1. Preparar una suspensión de glóbulos rojos de carnero GRC al 2% en TBS. Volúmen : 5 ml.
2. Ajustar espectrofotométricamente la suspensión de GRC.  
 En un tubo de ensayo se mezclan 0.3 ml de la suspensión de GRC + 1.7 ml de agua destilada. Leer la Do en un Coleman Jr. A 550 nm, utilizando como blanco agua destilada. El 100% de hemolisis debe dar una DO= 0.50 ,Si no se obtiene esta lectura, corregir el volúmen aplicando la siguiente ecuación.

$$DO_1 \times V_1 = DO_2 \times V_2$$

3. Diluir la hemolisina en TBS 1:2000, para utilizar un volumen de 5 ml.
4. Mezclar volúmenes iguales de hemolisina y GRC: añadir lentamente y agitando el matraz, 5 ml de la solución de hemolisina a 5 ml de la suspensión de GRC.
5. Incubar la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Luego colocar el matraz sobre hielo.
6. Preparar 3 diluciones del suero de cobayo (1:200, 1:250, y 1:300) a partir de una dilución inicial 1:50. 0.03 ml de suero + 1.47 ml de TBS (dilución 1:50).

Suero 1:50	TBS
0.4 ml	1.2 ml (dilución 1:200)
0.3 ml	1.2 ml (dilución 1:250)
0.3 m.	1.5 ml (dilución 1:300)

Mantener los tubos en frio, sobre el hielo.

7. En una gradilla, sobre hielo, colocar una serie de 4 tubos para cada dilución (12 tubos ), más 2 tubos controles ( testigos positivo y negativo).

Repartir el volumen de cada dilución en los cuatro tubos correspondientes, pipeteando cantidades diferentes a cada tubo. Luego añadir TBS hasta completar un volúmen final de 0.9 ml para cada tubo.

Tubo	1	2	3	4	T <sup>+</sup>	T <sup>-</sup>
Suero diluido ml.	0.5	0.35	0.25	0.15	-	-
TBS, ml.	0.4	0.55	0.65	0.75	-	0.9

9. Añadir a cada tubo 0.6 ml de la suspensión EA (eritrocitos sensibilizados).
10. Agitar fuertemente todos los tubos para mezclar bien.
11. Pasar la gradilla con los tubos a baño de María, 37°C durante 30 minutos. Agitar los tubos a intervalos de 10 minutos.
12. Al terminar la incubación, añadir 0.5 ml de TBS frio a todos los tubos menos al control positivo, el cual se le añade 1.4 ml de agua destilada. Agitar nuevamente.
13. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
14. Decantar a una cubeta y leer, en un Coleman Jr., a 550 nm, la DO del contenido de cada tubo. Utilizar como blanco el control negativo.

## RESULTADOS

Dilución		1:200	1:250	1:300	
		DO	%	DO	%
TUBO	1				
	2				
	3				
	4				
	T <sup>+</sup>		100%		

Sobre un papel semilogarítmico de probitas graficar la relación entre los porcentajes de hemólisis y la cantidad de suero diluido que se añadió a cada tubo. Hacer esto con las 3 diluciones utilizadas. Unir los puntos con un línea recta y determinar, para cada dilución, el volumen de la misma que produce un 50% hemólisis. La unidad 50%

_____	ml del suero diluído 1:200
_____	“ “ “ “ 1:250
_____	“ “ “ “ 1:300

Expresar las unidades 50% hemolíticas / ml de suero de cobayo do diluido. Calcular por una regla de tres, cuantas unidades 50% hemolíticas contiene 1 ml de suero diluido y luego multiplicar éste valor por el denominador de la dilución.

## **PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS.**

Los métodos de separación y purificación de anticuerpos pueden ser de dos clases:

Inespecíficos.- Cuando lo que se desea es separar las gamma -globulina del resto de las proteínas que constituyen el plasma, o bien;

Específicos.- Cuando se desea separar del suero o plasma un determinado tipo de anticuerpos; como por ejemplo cuando se separan los anticuerpos específicos para *E. coli* 026 de un suero que contiene anticuerpos frente a los antígenos de grupo de esta bacteria

Para la purificación específica de los anticuerpos es necesario utilizar reacciones antígeno - anticuerpo, en tanto que para la separación inespecífica se utilizan algunas de las propiedades físicas de los anticuerpos.

### **PRECIPITACION DE LA GAMMA - GLOBULINA CON SULFATO DE AMONIO**

En este método se precipita a la gamma-Globulina mediante la adición de solución saturada a temperatura ambiente de sulfato de amonio a tener una concentración en la mezcla de 1/3 de saturación. Esta precipitación se realiza varias veces con lo que se logra tener a la gamma-globulina con un grado bastante alto de pureza , el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  que queda " atrapado " en el precipitado de gamma-globulina se elimina mediante diálisis contra solución salina amortiguada con boratos. El producto resultante de éste método de purificación es la mezcla de todos los anticuerpos contenidos en el suero, pero libres de las demás proteínas que constituyen dicho suero.

#### **MATERIAL NECESARIO.**

- ◇ Suero de conejos inmunizados obtenido en las prácticas anteriores. 50 ml.
- ◇ Solución saturada de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , 80 ml.
- ◇ Solución 2n de NaOH, 10 ml.
- ◇ Solución salina isotónica, 110 ml
- ◇ Solución salina isotónica amortiguada con boratos, 8 - 10 litros.
- ◇ 3 Vasos de precipitado de 150 ml.
- ◇ 4 tubos de centrifuga de 50 ml
- ◇ 3 Pipetas de 1 ml divididas en 1/10
- ◇ 1 Probeta de 100 ml.
- ◇ Potenciómetro
- ◇ Agitador magnético con magneto.
- ◇ Centrifuga con cabezal y camisas para frascos, de 250 ml y para tubos de 50 ml.
- ◇ Material y equipo para diálisis.

TECNICA.

1. Colocar en un vaso de precipitado de 150 ml los 50 ml de suero de conejos inmunizados. Si no se tiene esta cantidad exacta calcular la proporción de solución de sulfato de amonio que se requiere para el volumen de suero que se tienen. Colocar el magneto dentro del vaso y éste sobre el agitados magnético, ajustar la velocidad de la agitación de manera de que no se forme espuma y adicionar gota a gota 25 ml de solución saturada a temperatura ambiente de sulfato de amonio. Al principio el precipitado que se forma se redisuelve inmediatamente, se debe tener especial cuidado en no adicionar otra gota de solución de sulfato hasta que el precipitado se haya redisuelto completamente. Posteriormente el precipitado debe seguirse haciendo gota a gota, de lo contrario quedan englobadas en el precipitado otras proteínas además de la gamma-globulina.
2. Cuando se han terminado de adicionar al solución de sulfato de amonio se ajusta el pH de la suspensión a 7.8 mediante la adición de solución 2N de NaOH. Cuando se está trabajando con cantidades menores de las que se especifican aquí se debe emplear una solución más diluida ( 0.5 a 1N) y cuando se trabaja con cantidades mayores, de 100 ml o más, debe emplearse una solución de NaOH más concentrada (4.a 5N). El empleo de una solución muy alcalina con volúmenes pequeños puede dar lugar a la desnaturalización de las proteínas, en tanto que el empleo de soluciones de NaOH muy diluidas con volúmenes muy grandes de la mezcla va a diluir el sistema hasta el punto en que la gamma-globulina se redisuelve.
3. Continuar con la agitación magnética durante 2 a 3 horas para eliminar mecánicamente las proteínas que hayan quedado englobadas en el precipitado de gamma-gobulinas.
4. Centrifugar la suspensión a temperatura ambiente durante 30 minutos a 3000 rpm. Éste primer precipitado contiene toda la gamma-globulina pero impurificada con trazas de albúmina.
5. Decantar y desechar el sobrenadante. Disolver el precipitado en el volumen original (50 ml) de solución salina isotónica.
6. La purificación de la gamma-globulina se logra mediante dos precipitaciones más: para la segunda repetir los pasos del 1 al 5 y ara la tercera los pasos del 1 al 4.
7. Disolver el precipitado obtenido en la tercera precipitación en la mitad del volumen original (25 ml) de solución salina amortiguada con boratos.

8. Eliminar el  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  mediante diálisis contra solución salina amortiguada con boratos, cambiando esta solución por lo menos dos veces al día y manteniendo el equipo de diálisis en refrigeración a 4 grados centígrados hasta que el dializado de negativa la reacción de sulfatos. (al adicionar unas gotas de una solución al 10% de cloruro o de hidróxido de bario a una muestra del dializado, si se forma un precipitado blanco de sulfato de bario la diálisis no ha terminado aún). Esta diálisis se lleva a cabo a pH de 8.4 para evitar la desnaturalización de las proteínas que ocurre a pH neutro.

9. Al término de la diálisis pasar el dializado a un tubo de centrífuga de plástico, de 50 ml, colocarlo en una camisa para frasco de 250 ml y rodearlo de hielo finamente picado. Centrifugar a aproximadamente 4 C durante 30 minutos a 3000 rpm. Esta centrifugación tiene por objeto eliminar algunas partículas insolubles que se forman durante la diálisis. La solución resultante debe presentar solo una ligera opalescencia.

10. Para la conservación de esta gamma- globulina purificada puede filtrarse por Seitz, liofilizarse o bien simplemente adicionarle un conservador (Azida de sodio en proporción de 1 mg de timerosal a una concentración final de 1:10 ,000 o glicerina a una concentración final del 50%).

#### ***PRECIPITACIÓN DE LA GAMMA-GLOBULINA CON ETANOL.***

Este método fué descrito por Nichol y Deutsch. Los anticuerpos que se obtienen por éste procedimiento tienen mayor grado de pureza, que los que se obtienen por el método anterior. La purificación se logra mediante tres precipitaciones con etanol. Para obtener buenos resultados es necesario controlar en forma exacta las condiciones de pH, concentración de etanol y temperatura que se especifican en cada caso.

#### **MATERIAL NECESARIO.**

- ◇ Suero de conejos inmunizados obtenido en las prácticas anteriores, 50 ml.
- ◇ Etanol al 50%, aprox. 500 ml
- ◇ Solución 0.05 M de ácido acético, 50 ml
- ◇ Solución 0.05 M de  $\text{Na}_2\text{P}_04$  50 ml
- ◇ Solución 1.0 M de NaCl, 5 ml.
- ◇ Solución 0.01 M de NaCl, aprox 500 ml.
- ◇ 1 vaso de precipitado de 1000 ml
- ◇ 1 Embudo de separación de 250 ml con una pipeta capilar adaptada en la punta mediante un pedazo de látex.
- ◇ 1 Probeta graduada de 100 ml
- ◇ 1 Probeta graduada de 250 ml

- ◇ 8 tubos de centrifuga de 50 ml de plástico.
- ◇ 1 agitador de vidrio.
- ◇ 2 Termómetros de -20 a 50°.C
- ◇ 1 pipeta de 1 ml dividida en 1/10
- ◇ 2 pipetas de 10 ml divididas en 1/10
- ◇ 1 Espátula de 15 cm.
- ◇ 1 Soporte
- ◇ 2 Anillos de 8 - 10 Cm
- ◇ 4 Pinzas
- ◇ Balanza granataria.
- ◇ Potenciómetro
- ◇ Agitador magnético con magneto.
- ◇ Gradilla para tubos de 3.5 cm.
- ◇ Centrifuga con cabezal y camisas para frascos de 250 ml y para tubos de 50 ml.
- ◇ Baño con hielo picado.
- ◇ Sal gruesa para el baño anterior
- ◇ Cuarto fio a aproximadamente 5 c
- ◇ Material y equipo para diálisis.
- ◇ Material y equipo para liofilización.

#### TECNICA.

Todo el proceso se lleva a cabo en el cuarto fio a aproximadamente 5°.C, todos los recipientes de los reactivos deben enfriarse a esta temperatura antes de comenzar la precipitación. El etanol se adiciona gota a gota mediante el embudo de separación que lleva adaptada en el tubo de salida un pipeta capilar para que el tamaño de las gotas sea pequeños las mezclas se hacen con agitación constante en el agitador magnético, cuya velocidad debe regularse de manera que no se forme espuma.

La cantidad de etanol que debe agregarse en cada paso (Precipitaciones Nos. I, II y III se calculan mediante la siguiente fórmula.

$$V_{50} = \frac{C_2 \times V_{pH}}{C_1 - C_2}$$

$V_{50}$ :

Volumen de etanol al 50% que deber ser adicionado a la solución de proteínas.

$V_{pH}$ :

Volumen de la solución de proteínas ajustada a un pH dado.

$C_1$ =

Concentración del etanol (50%)

$C_2$ =

Concentración final de etanol deseada.

1. Diluir un volumen de suero con 3 volúmenes de agua destilada. Dependiendo del pH que tenga esta solución utilizar la solución 0.05 M de ácido acético o la solución 0.05 M de fosfato disódico para llevarla a pH de 7.6 - 7.7
2. Colocar la solución en el baño de hielo picado y sal gruesa.
3. Con agitación constante agregar etanol al 50%, gota a gota, hasta tener una concentración final del 20%. Durante la adición del alcohol y el subsecuente período de precipitación, la temperatura debe mantenerse a 0 - 1°C del baño del hielo picado y sal gruesa es 3 a 5 grados más baja. Si se observa que durante la adición del alcohol la temperatura de la mezcla aumenta más de 1°C quiere decir que la adición se está haciendo con demasiada rapidez y hay que hacerla más lentamente. Para calcular el volumen de etanol que debe ser adicionado a la solución de proteínas, se aplica la siguiente ecuación.

$$V_{50} = \frac{2}{3} V_{7.7}$$

4. Dejar la mezcla etanol - proteínas durante toda la noche a la temperatura de cero grados centígrados.
5. Pesar los tubos de centrifuga de 50 ml, anotar en cada uno su peso y colocarlos en el baño de hielo picado y sal para que se enfríen a cero grados centígrados y pasar a ellos la mezcla. Colocar los tubos en las camisas para frascos de 250 ml rodeándolos con hielo picado y sal gruesa para centrifugar a cero grados durante 30 minutos a 3000 rpm, para reunir el precipitado.
6. Descantar y desechar el sobrenadante, colocar los tubos invertidos sobre un trozo de papel absorbente hasta que se escurran perfectamente, esto se hace en el cuarto fio. El precipitado que se designa como I, contiene la  $\gamma_2$ -globulina que puede separarse de la B y la  $\gamma_1$ -globulinas mediante dos precipitaciones más.

2ª. Precipitación (II)

1. Pesar los tubos de centrifuga con el precipitado para por diferencia, calcular el peso del precipitado húmedo y así poder realizar el siguiente paso.
2. Suspender el precipitado en solución 0.01 M de NaCl en la cantidad necesaria para tener el 1% p/v aproximadamente. Ajustar el pH a 5.2 con solución 0.05M de ácido acético. Enfriar la mezcla a una temperatura de 0 a - 5°C y mantenerla a esa temperatura.
3. Con agitación continua adicionar etanol al 50%, este etanol debe tener una concentración iónica de 0.01, la cual se logra adicionándole la cantidad necesaria de solución 1M de NaCl. El etanol se adiciona gota a gota hasta tener una concentración final del 10% para calcular esta cantidad se aplica la siguiente ecuación:

$$V_{50} = \frac{1}{4} V_{5.2}$$

4. Dejar la mezcla durante toda la noche a una temperatura de 0 a - 5°C.
5. Reunir el precipitado mediante centrifugación, rodeando los tubos con hielo picado y sal gruesa, empleando las camisas para frascos de 250 ml. durante 30 minutos a 3000 rpm y a la temperatura de 0 a -5° C . Recoger el sobrenadante. ( el precipitado contiene las B y y-globulinas).

3ª. PRECIPITACIÓN (III).

1. Ajustar el pH del sobrenadante de la precipitación II a 7.2 - 7.4 con solución 0.05 M de fosfato disódico. Enfriar a -10°C y mantener esta temperatura.
2. Con agitación constante adicionar etanol al 50% (esta solución debe ajustarse a una fuerza iónica de 0.01, mediante la adición de la cantidad necesaria de solución 1 M de cloruro de sodio), hasta tener una concentración final de etanol del 25% como la concentración de etanol del sobrenadante ya es de aproximadamente el 10%, ( el etanol que se agregó para la precipitación II), aplicar la siguiente ecuación.

$$V_{50} = ( 25 - 10 ) (V_{7.2}) / ( 50 - 25 )$$

$$V_{50} = 3/5 V_{7.2}$$

3. Dejar la mezcla durante toda la noche a  $-10^{\circ}\text{C}$ .
4. Reunir el precipitado por centrifugación a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 20 minutos a 3000 rpm. Este precipitado contiene a la  $\gamma$ 2-Globulina. Decantar el sobrenadante y dejar los tubos invertidos sobre un papel absorbente hasta que escurra perfectamente. Suspende el precipitado en agua destilada, y liofilizar. Conservar producto liofilizado en refrigeración. Si no se tiene facilidades para efectuar la liofilización el precipitado puede disolverse y dializarse contra solución salina amortiguada con boratos. La gamma - 2 globulina obtenida por este método, tiene una pureza del 95 al 98 por ciento probada por electroforesis.

### **SEPARACIÓN DE LA GAMMA - GLOBULINA CON DEAE CELULOSA.**

En éste método se emplea la dietilaminoetil celulosa (DEAE) que es un intercambiador iónico que tiene la propiedad de absorber a todas las proteínas plasmáticas a excepción de las gamma-globulinas. Peterson y Sorber desarrollaron éste método trabajando con suero crudo para absorber todas las fracciones que no son gamma-globulinas. Para posteriormente eludir en forma fraccionada las demás que pueden interesar.

#### **MATERIAL NECESARIO.**

- ◇ Suero de conejos inmunizados en las prácticas anteriores, 60 ml.
- ◇ DEAE-Celulosa, polvo seco, aproximadamente 45 g
- ◇ Solución salina amortiguada con fosfatos pH 7.5 aproximadamente 10 litros.
- ◇ 1 Embudo Buchner de 20 cm
- ◇ 1 Matríz de Kitasato de 4,000 ml con tapón de hle para sostener el embudo anterior
- ◇ 1 Vaso de precipitado de 600 ml
- ◇ 1 Vaso de precipitado de 400 ml
- ◇ 1 hoja de papel Whatman No. 1
- ◇ 1 Tijeras de puntas rectas.
- ◇ Aspirador de agua con tubo de succión.
- ◇ Agitador magnético con magneto.
- ◇ Balanza analítica.
- ◇ Balanza granatraria.
- ◇ Material y equipo para diálisis
- ◇ Material y equipo para pervaporación.
- ◇ Cuarto frío ajustado a  $8 -10^{\circ}\text{C}$ .

TECNICA.

Todos los pasos se llevan a cabo a una temperatura entre 8 y 10°C. El suero por purificar debe tener un título alto de anticuerpos.

1. Dializar los 50 ml. de suero inmune durante un periodo de 8 a 16 horas contra 8 litros de solución salina amortiguada con fosfatos. Separar una muestra de 10 ml del dializado para determinar la cantidad de anticuerpos presente.
2. Humedecer la DEAE - celulosa de la siguiente manera:
  - a) Preparar una suspensión acuosa muy espesa con 45 g de DEAE - celulosa, equivalen a 340 - 350 g de celulosa húmeda regenerada ( ver nota ). Colocar un disco de papel filtro en el embudo Buchner y vaciar en éste la pasta de celulosa.
  - b) Aplicando succión eliminar toda el agua que sea posible.
  - c) Adicionar aproximadamente 500 ml de solución salina amortiguada, repartida en alícuotas de 100 ml.
    - d). Dejar que la última porción ( 100 ml ) de solución salina se filtre por gravedad con objeto de que resulte un grado de humedad homogéneo y adecuado. Cuando el flujo del filtrado se ha reducido a gotas ocasionales dejar 10 minutos más antes de quitar la celulosa del embudo de Buchner.
3. Pesar 340 g de celulosa húmeda, pasarlos al vaso de precipitado de 600 ml y adicionar 50 ml de solución salina amortiguada, mezclar perfectamente.
4. Colocar el vaso con la celulosa sobre el agitador magnético y regular la agitación a manera de que sea suave. Con agitación constante adicionar el suero dializado ( Paso No. 1 ) a la suspensión de celulosa.
5. Dejar reposar la mezcla durante 5 horas para que se equilibre el suero.
6. Adicionar 100 ml de solución salina amortiguada empleando agitación constante.
7. Colocar un disco de papel filtro Whatman No. 1 en el embudo Buchner y vaciar en él la mezcla. Filtrar empleando succión y recoger el filtrado que debe etiquetarse como "Fracción I".

Esta solución contiene  $\gamma$  - globulina con un grado de pureza del 95 al 100 por ciento y aproximadamente el 50 por ciento de los anticuerpos presentes.

8. La "Fracción II" se obtiene lavando la celulosa contenida en el Buchner con 50 - 100 ml de solución salina amortiguada. El material obtenido en éste paso es similar en cuanto a pureza al de la fracción I, pero contiene una menor cantidad de anticuerpos; aproximadamente el 20%
9. Mezclar las fracciones I y II y reducir el volumen por pervaporación a sólo 30 - 40 ml.
10. Dializar la  $\gamma$  - globulina así como la muestra de suero dializado que se separó en el paso No. 1 contra solución salina amortiguada con boratos.
11. Si los dializados contienen partículas de material insoluble clarificar por filtración el papel Whatman o bien por centrifugación, desechando el sedimento. Determinar el título de los anticuerpos presente en el suero crudo dializado así como en la gamma-globulina purificada, para calcular el rendimiento.

Nota.

La DEAE- Celulosa se regenera para su posterior empleo de la siguiente manera:

#### MATERIAL NECESARIO.

Solución 0.1N de HCL, aproximadamente 1,500 ml.

Solución 0.1N de NaOH, aproximadamente 1,500 ml.

1 Embudo Buchner de 20 cm

1 Matraz de kitasato de 4,000 ml con tapón de hule para sostener el embudo anterior.

1 Disco de papel Whatman No. 1 de 20 cm,

Aspirador de agua con tubo de succión.

1. Al terminar de emplear el DEAE - Celulosa (paso No. 8), lavarla varias veces con volúmenes grandes de agua destilada, empleando, succión para eliminar el agua.
2. Lavar con 200 - 300 ml de solución 0.1N de NaOH, después con agua destilada para eliminar la sosa.
3. Continuar con lavados alternados de ácido y sosa, lavando en cada uno con agua destilada, es decir, solución 0.1N de HCl, agua destilada. Repetir éste ciclo de 4 a 5 veces.
4. Después del último lavado con agua destilada conservar la celulosa suspendida en agua destilada o bien si se va a volver a usar de inmediato, suspenderla en solución salina amortiguada.
5. Preparación de las soluciones que se emplean, en los métodos anteriores:

**Solución salina amortiguada con boratos:**

Amortiguador de boratos pH 8.4 - 8.5

Acido bórico.	6.184 g.
Bórax	- - - -
( $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ )	9.536 g.
NaCl	4.384 g.
$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p.	1,000 ml.

Para preparar la solución salina isotónica amortiguada mezclar 400 ml de éste amortiguador de boratos con 8,000 ml de solución salina isotónica.

Solución salina amortiguada con fosfatos:

Solución 0.015M de cloruro de sodio adicionada de amortiguador 0.01M de fosfatos, pH final 7.5

A) Solución 1M de fosfato monobásico:

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	13.7998 g
$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p	100 ml

B) Solución 1M de fosfato dibásico.

$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	26.8077 g
$\text{H}_2\text{O}$ c.b.p	100 ml.

## BIBLIOGRAFIA

- (1) Bellanti J. A. INMUNOLOGÍA, Edit. Interamericana, Tercera Edición, México 1986.
- (2) Roitt M. INMUNOLOGÍA. Edit. Salvat, Segunda Edición. Barcelona España 1991.
- (3) Fundemberg. INMUNOLOGÍA CLÍNICA. Edit. El Manual Moderno, Tercera Edición, México 1982.
- (4) Cabrera, FUNDAMENTOS Y PRACTICAS DE INMUNOLOGÍA, Edit. UAQ, Primera edición, Querétaro 1982.
- (5) Kumate Jesús, MANUAL DE INFECTOLOGÍA CLÍNICA, Edit. Mendez, Decimo cuarta edición, México 1994.
- (6) Harrison, PRINCIPIOS DE MEDICINA INTERNA, Edit. Mc Graw-Hill, Séptima edición, Tomo 1, México 1989.
- (7) Davson Eggleton, FISILOGIA HUMANA, Edit. Aguilar, Tercera edición, España 1968.
- (8) Medina Aguilar, R. INMUNOHEMATOLOGÍA APLICADA AL BANCO DE SANGRE, Edit. Sociedad Mexicana de Hematología, Primera edición, México 1979.
- (9) Gardner, PRINCIPIOS DE GENÉTICA, Edit. Limusa, Quinta edición, México 1980
- (10) Kelton- Heddle, TRANSFUSIÓN SANGUÍNEA, Edit. Doyma, Primera edición España 1984.
- (11) Bach, J.F. INMUNOLOGÍA, Edit. Limusa, Primera edición, México 1984.
- (12) Todd-Safort, Davidsohn, DIAGNOSTICO Y TRATAMIENTO CLINICOS POR EL LABORATORIO, Edit. Salvat, Octava edición, México 1991.
- (13) Stites, D.P., Terr, Abba Y. IMUNOLOGIA BASICA Y CLINICA, Edit, EL Manual Moderno, Septima edición, México 1993.
- (14) Davis,B.D. Dulbecco,R. TRATADO DE MICROBIOLOGÍA, Edit. Salvat, Segunda Edición, México 1978.

(15) Pelczar, M.J. MICROBIOLOGIA, Edit. Mc Graw-Hill, cuarta edición, México 1982

(16) INER Investigación, COMPLEJO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDAD, Edit. INER, primera edición, México 1993

(17) Weir Donald Stewart. INMUNOLOGÍA. Edit, El Manual Moderno, segunda edición, México 1995.

---