

64
2 Gen.



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMEN DE TESIS DE GRADUACION
EN QUIMICA

**“ENSAYO INMUNOENZIMATICO EN FASE SOLIDA
PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS
CONTRA PROTEINAS DEL SUERO DE PALOMA EN
PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL”**

T E S I S

Que para obtener el titulo de:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P r e s e n t a :

BERNARDO MARTINEZ PARENTE RICAUD

México, D. F.

1985



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

CAPÍTULO	PÁG.
I. INTRODUCCION	1
II. GENERALIDADES	5
1. HIPERSENSIBILIDAD	5
2. NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD	11
3. ENFERMEDAD DEL CRIADOR DE PALOMAS	15
4. MÉTODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA	16
5. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA)	17
5.1 PRINCIPIO DEL MÉTODO DE ELISA	21
5.2 APLICACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA	22
III. PARTE EXPERIMENTAL	29
1. ESQUEMA GENERAL	29
2. DESARROLLO DEL MÉTODO ELISA	31
2.1 ANTÍGENOS DE PALOMA	31
2.2 OBTENCIÓN DEL SUERO ANTI-IGG HUMANA	31
2.2.1 PURIFICACIÓN DE IGG HUMANA	31
2.2.2 OBTENCIÓN DE SUERO ANTI-IGG HUMANA	32
2.2.3 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA	33
2.3 OBTENCIÓN DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA	34
2.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA	35
2.4.1 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA	35
2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE ANTÍGENO (SUERO DE PALOMA) Y DE SUEROS CONTROLES POSITIVOS Y	

NEGATIVOS.	37
2.4.3 DETERMINACIÓN DEL VALOR BASE DE DENSIDAD ÓPTICA (D.O.) PARA SUE- ROS NEGATIVOS.	38
3. DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE CLASE IGG EN MUESTRAS DE PACIENTES CON NEUMO- NITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA	38
3.1 MÉTODO DE ELISA	38
3.2 ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL MÉTODO ELISA	39
3.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERS - TICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PA - LOMA POR CIEF	40
4. ESTUDIOS REALIZADOS EN LÍQUIDO DE LAVA- DO BRONCOALVEOLAR (LBA) EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBL I DAD A PALOMA	40
IV. RESULTADOS Y DISCUSION	42
V. CONCLUSIONES	60
RESUMEN	62
APENDICES	
I. METODOS QUIMICOS	63
1. PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON SULFATO DE AMONIO SATURADO	63
2. CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO EN COLUMNA DE DEAE CE - LULOSA	65
3. CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS POR EL MÉTODO DE LOWRY	67
II. METODOS INMUNOQUIMICOS	69
1. INMUNOELECTROFORESIS (IEF)	69

2. INMUNODIFUSIÓN DOBLE (IDD). MÉTODO DE OUCHTERLONY	71
3. PURIFICACIÓN ESPECÍFICA DE ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA	73
4. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF)	75
BIBLIOGRAFIA	79

I. INTRODUCCION.

EL PULMÓN ES UN ÓRGANO CON UNA ENORME SUPERFICIE DE INTERCAMBIO CALCULADA EN APROXIMADAMENTE 70 m^2 EN UN VARÓN ADULTO, EN ESTA SUPERFICIE HAY POR UN LADO, LA EXPOSICIÓN AL AMBIENTE, EN EL QUE LAS PARTÍCULAS SUSPENDIDAS EN EL AIRE, DE UN TAMAÑO DE 5 MICRAS O MENOR SE DEPOSITAN EN EL EPITELIO ALVEOLAR. POR OTRO LADO ESTÁ EXPUESTO AL MEDIO INTERNO, YA QUE TODO EL GASTO CARDÍACO PASA A LA CIRCULACIÓN MENOR O PULMONAR. EN EL PULMÓN HAY TAMBIÉN CÉLULAS INMUNOCOMPETENTES, MACRÓFAGOS ALVEOLARES, Y ACÚMULOS SUBMUCOSOS DE LINFOCITOS, LO CUAL CONFIERE UNA CAPACIDAD INMUNOLÓGICA AL ÓRGANO.

ENTRE EL MATERIAL SUSPENDIDO EN EL AIRE QUE LLEGA AL EPITELIO ALVEOLAR HAY COMPONENTES ORGÁNICOS, Y EN CIERTOS CASOS PUEDE DESARROLLARSE UNA RESPUESTA INMUNE CON GENERACIÓN DE ANTICUERPOS Y CÉLULAS SENSIBILIZADAS, QUE POTENCIALMENTE PUEDE FACILITAR UNA REACCIÓN INFLAMATORIA INTERSTICIAL ES DECIR, UNA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD.

LOS AGENTES ANTIGÉNICOS SON POLVOS ORGÁNICOS QUE DEBIDO A SU TAMAÑO PUEDEN DEPOSITARSE A NIVEL ALVEOLAR EN UN BREVE PERÍODO DE TIEMPO. LOS GRANJEROS EXPUESTOS A LA PAJA HÚMEDA, PUEDEN DEPOSITAR ARRIBA DE 750 000 ESPORAS DE HONGOS POR MINUTO EN SUS PULMONES POR LO QUE SE DICE QUE LA RESPUESTA CLÍNICA A ESTE CONTACTO DEPENDE PRINCIPALMENTE DE LA REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA DE CADA PERSONA.

EXISTEN GRAN VARIEDAD DE ANTÍGENOS QUE PUEDEN PRODUCIR LA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD, POR LO QUE EXIS-

TEN OTRO TANTO DE ENFERMEDADES DESCRITAS DE ACUERDO AL ANTÍGENO QUE LO CAUSA. DENTRO DE ESTE GRUPO DE ENFERMEDADES ESTÁ LA ENFERMEDAD DEL CRIADOR DE PALOMAS O PULMÓN DEL CRIADOR DE PALOMAS EN LA CUAL SE PRESENTA UNA RESPUESTA INMUNE CONTRA PROTEÍNAS DEL SUERO, EXCRETAS Y PLUMAS DE ESTAS AVES.

LOS HÁBITOS DE HIGIENE DEFICIENTES TAL VEZ EXPLIQUEN LA FRECUENCIA DEL PADECIMIENTO POR LO QUE FACTORES DE TIPO SOCIOCULTURAL PUEDEN SER IMPORTANTES EN SU ETIOPATOGENIA, ADEMÁS LA CARGA ANTIGÉNICA DEBE SER CONSIDERABLE YA SEA POR EXPOSICIÓN DIRECTA MASIVA O POR EXPOSICIÓN PROLONGADA.

LA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD A PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA ES UNA ENFERMEDAD COMÚN EN NUESTRO MEDIO QUE FACILMENTE SE CONFUNDE CON OTROS PADECIMIENTOS PULMONARES, PRINCIPALMENTE TUBERCULOSIS. LOS PACIENTES QUE SUFREN ESTA ENFERMEDAD, EN OCASIONES LLEGAN A CENTROS ESPECIALIZADOS EN ENFERMEDADES RESPIRATORIAS CON DIAGNÓSTICOS EQUIVOCADOS Y LA ENFERMEDAD AVANZADA. EL HECHO DE QUE EL DIAGNÓSTICO NO SEA PRECISO, EN MUCHOS DE LOS CASOS IMPIDE CONOCER LA FRECUENCIA DE ESTE PADECIMIENTO QUE TAN SÓLO EN EL INSTITUTO NACIONAL DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS PRESENTÓ 75 CASOS EN DOS AÑOS DE ACUERDO A CIFRAS REPORTADAS (10).

EL DIAGNÓSTICO DE ESTA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD SE HACE EN BASE A LOS DATOS CLÍNICOS QUE SE PRESENTAN EN EL PACIENTE JUNTO CON EL ANTECEDENTE DE EXPOSICIÓN A PALOMAS Y SE CONFIRMA EN EL LABORATORIO POR LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN EL SUERO DE ESTOS PACIENTES CONTRA

PROTEÍNAS DEL SUERO Y EXCRETAS DE PALOMA.

DEBIDO A LA IMPORTANCIA DE LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES EN ESTOS PACIENTES, SE HA DESARROLLADO UN MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO EN FASE SÓLIDA QUE PERMITE DEMOSTRARLOS AÚN A MUY BAJAS CONCENTRACIONES.

LOS MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS QUE FUERON DESCRITOS INICIALMENTE POR ENGVALL Y PERLMAN (16) PRESENTAN VARIAS VENTAJAS SOBRE OTROS MÉTODOS INMUNOQUÍMICOS, EMPLEAN ANTICUERPOS O ANTÍGENOS CONJUGADOS A ENZIMAS DONDE LAS DOS PARTES MANTIENEN SU ACTIVIDAD. EXISTEN OTROS MÉTODOS QUE EMPLEAN ANTICUERPOS O ANTÍGENOS CONJUGADOS BIEN A UN COMPUESTO FLUORESCENTE (INMUNOFLUORESCENCIA) O BIEN A ISÓTOPOS RADIOACTIVOS (RADIOINMUNOANÁLISIS).

LA INMUNOFLUORESCENCIA HABITUAL ES SÓLO SEMICUANTITATIVA Y NO PERMITE CUANTIFICAR LOS ANTICUERPOS YA QUE DEPENDE DE LA APRECIACIÓN VISUAL DE LA FLUORESCENCIA (UN ENSAYO CUANTITATIVO ES POSIBLE PERO ES EXCESIVAMENTE COMPLEJO Y CARO). POR OTRA PARTE EL RADIOINMUNOANÁLISIS ES ALTAMENTE SENSIBLE Y PERMITE UNA CUANTIFICACIÓN PRECISA, SIN EMBARGO HAY PROBLEMAS CON LA VIDA MEDIA DEL ISÓTOPO, CON EL MANEJO DEL MATERIAL RADIOACTIVO ADEMÁS DE QUE EL EQUIPO NECESARIO ES BASTANTE SOFISTICADO.

LOS ENSAYOS INMUNOENZIMÁTICOS COMBINAN LAS VENTAJAS DE AMBOS MÉTODOS Y ELIMINAN SUS DESVENTAJAS. SON ALTAMENTE SENSIBLES, LOS REACTIVOS NO REPRESENTAN PELIGRO, SON ESTABLES Y TIENEN UNA VIDA MEDIA MUY LARGA. MÁS AÚN, LA ESTIMACIÓN DE LOS RESULTADOS PUEDE SER YA SEA SEMICUANTITATIVA O CUANTITATIVA. EL RANGO DE APLICACIÓN DE ESTE ENSAYO ES MUY GRANDE Y PUEDE INCLUSO REFORZAR O REEMPLAZAR

OTRAS PRUEBAS SEROLÓGICAS.

EN BASE A SUS CUALIDADES, ESTE MÉTODO, QUE ADEMÁS DE SER SENSIBLE ES ESPECÍFICO Y DE FÁCIL REALIZACIÓN, SE HA DESARROLLADO PARA ADAPTARLO AL DIAGNÓSTICO DE HIPERSENSIBILIDAD A PROTEÍNAS DE PALOMA EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL.

II. GENERALIDADES.

1. HIPERSENSIBILIDAD.

CUANDO A FINES DEL SIGLO XIX SE CONOCIÓ QUE LA RESISTENCIA A MICROORGANISMOS Y TOXINAS ERA FUNCIÓN DE UN SISTEMA INMUNE, SE PENSÓ EN ÉSTE CON UN SENTIDO TELEOLÓGICO COMO UN MECANISMO DE PROTECCIÓN, POR LO QUE FUÉ MUY SIGNIFICATIVA LA OBSERVACIÓN DE PORTIER Y RICHET QUE ESTUDIABAN LA TOXINA DE LA ANÉMOMA DE MAR, Y DE ACUERDO A LA ÉPOCA, INMUNIZARON PERROS CON EL FIN DE PROTEGERLOS DE LOS EFECTOS DE LA TOXINA. SIN EMBARGO, UNA SEGUNDA INYECCIÓN DE LA TOXINA PROVOCÓ UNA ENFERMEDAD AGUDA Y MORTAL (32). ÉSTE FENÓMENO FUÉ LLAMADO ANAFILAXIA, EN CONTRASTE CON PROFILAXIA, EL EFECTO PROTECTOR HASTA ENTONCES CONOCIDO; SU MECANISMO NO FUÉ EXPLICADO ENTONCES. POCO DESPUÉS EN 1906 VON PIRQUET INTRODUJO EL CONCEPTO DE ALERGIA (GR. ALLOS=OTRO, ERGON=TRABAJO) PARA DESIGNAR AQUELLAS RESPUESTAS "INESPERADAS" QUE RESULTABAN DEL SEGUNDO CONTACTO CON UNA SUSTANCIA. ASÍ SE ACEPTÓ QUE EL SISTEMA INMUNE PODÍA PROPORCIONAR, EN EFECTO, PROTECCIÓN, O BIEN CAUSAR DAÑO TISULAR POR "HIPERSENSIBILIDAD" (61).

EN 1963 GELL Y COOMBS PUBLICARON SU CLASIFICACIÓN DE LAS REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD EN BASE A LOS MECANISMOS DE DAÑO TISULAR INVOLUCRADOS. ÉSTA CLASIFICACIÓN COMPRENDE 4 TIPOS:

TIPO I o ANAFILÁCTICO

TIPO II o CITOTÓXICA

TIPO III o MEDIADA POR COMPLEJOS

TIPO IV o HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA O MEDIADA POR CÉLULAS.

DE ACUERDO A ESTA CLASIFICACIÓN LOS TIPOS I, II Y III DEPENDEN DE LA INTERACCIÓN DEL ANTÍGENO CON EL ANTICUERPO, LO CUAL PRODUCIRÁ UNA RESPUESTA EN UNOS POCOS MINUTOS U HORAS, POR LO QUE SON LLAMADAS REACCIONES DE TIPO INMEDIATO, MIENTRAS EL TIPO IV ES LLAMADO DE HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA O INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS YA QUE INVOLUCRA RECEPTORES UNIDOS A LA SUPERFICIE DE LINFOCITOS MÁS BIEN QUE MOLÉCULAS QUE DIFUNDEN FACILMENTE (11).

EN EL TIPO I O ANAFILÁCTICO, LLAMADO TAMBIÉN ALÉRGICO, O MEDIADO POR REAGINAS, LAS INMUNOGLOBULINAS DE LA CLASE E, QUE SON HOMOCITOTRÓPICAS, SE UNEN A LA SUPERFICIE DE LOS BASÓFILOS POR MEDIO DE SU REGIÓN Fc QUE ES RECONOCIDA POR RECEPTORES DE MEMBRANA. ÉSTOS ANTICUERPOS SON PRODUCIDOS POR UN ESTÍMULO PREVIO CON EL ALERGENO O ANTÍGENO, DE MANERA QUE AL EXISTIR UN NUEVO CONTACTO, EL ANTÍGENO SE UNE A LA IGE FORMANDO UN PUENTE ENTRE VARIAS MOLÉCULAS DE IGE LO QUE PRODUCE LA DEGRANULACIÓN DE LAS CÉLULAS COMO RESULTADO DE UNA SERIE DE REACCIONES, PRINCIPALMENTE LA ENTRADA DE CALCIO A LA CÉLULA Y LA CAÍDA DEL NIVEL DE AMPc O EL AUMENTO DEL GMPc. LA DEGRANULACIÓN DE LOS BASÓFILOS Y MASTOCITOS O CÉLULAS CEBADAS, LIBERA AMINAS VASOACTIVAS (HISTAMINA Y SEROTONINA) Y OTROS MEDIADORES COMO LAS CININAS, PRINCIPALMENTE BRADICININA, Y PROSTANOIDES (LEUCOTRIENOS DERIVADOS DEL ÁCIDO ARAQUIDÓNICO) ENTRE LOS QUE SE ENCUENTRA LA SUSTANCIA DE REACCIÓN LENTA DE LA ANAFILAXIA (SRA-A). ÉSTOS ACTÚAN SOBRE MÚSCULOS LISOS ADYACENTES Y CÉLULAS ENDOTELIALES VASCULARES PRODUCIENDO EDEMA LOCAL Y CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO. ADEMÁS SE PRODUCE EL FACTOR QUIMIOTÁCTICO DE LOS EOSINÓFILOS DE LA ANAFILAXIA (ECF-A) QUE CAUSA LA ATRACCIÓN DE LOS EOSINÓFILOS Y EL FACTOR DE ACTIVACIÓN DE LAS PLAQUETAS (PAF) LAS CUALES TAMBIÉN LIBERAN HISTAMINA Y

SEROTONINA (27,48),

EN EL TIPO II O CITOTÓXICA EL ANTÍGENO QUE ESTÁ PRESENTE EN LA SUPERFICIE DE UNA CÉLULA YA SEA UN COMPONENTE DE LA MEMBRANA CELULAR O QUE SE ENCUENTRE ADHERIDO PASIVAMENTE A ELLA, AL REACCIONAR CON SU ANTICUERPO CAUSA LA MUERTE CELULAR YA QUE PROMUEVE EL CONTACTO CON FAGOCITOS POR ADHERENCIA OPSÓNICA DIRECTA A TRAVÉS DE LA UNIÓN AL Fc DE LAS INMUNOGLOBULINAS O A TRAVÉS DE LA UNIÓN DEL C3. LA MUERTE CELULAR TAMBIÉN PUEDE PRODUCIRSE AL ACTIVARSE TODA LA CADENA DEL COMPLEMENTO LO QUE DA COMO RESULTADO EL ROMPIAMIENTO DE LA MEMBRANA POR LA ACCIÓN DE C8 Y C9. ADEMÁS LA UNIÓN DEL ANTICUERPO A LA MEMBRANA CELULAR PUEDE PRODUCIR EL MECANISMO DE CITOTOXICIDAD SUGERIDO POR PEARLMANN Y HOLM EN 1969, DONDE LAS CÉLULAS CUBIERTAS CON BAJAS CONCENTRACIONES DE IGG, SON DESTRUÍDAS INESPECIFICAMENTE POR CÉLULAS LINFORÉTICULARES NO SENSIBILIZADAS QUE NO TIENEN LOS MARCADORES CARACTERÍSTICOS DE CÉLULAS T Y B MADURAS Y HAN SIDO LLAMADAS CÉLULAS K. ESTAS CÉLULAS PRESENTAN RECEPTORES ESPECÍFICOS PARA LOS FRAGMENTOS Fc DE LAS IGG POR LO QUE ESTE MECANISMO ES LLAMADO DE CITOTOXICIDAD CELULAR DEPENDIENTE DE ANTICUERPOS (ADCC). SE HAN DESCRITO OTRA SERIE DE CÉLULAS QUE TIENEN ESTA ACTIVIDAD "IN VITRO", ENTRE ELLAS SE ENCUENTRAN POLIMORFONUCLEARES, MACRÓFAGOS, PLAQUETAS Y CÉLULAS DE HÍGADO FETAL.

EN ALGUNOS CASOS LA REACCIÓN NO ES CITOTÓXICA, LOS ANTICUERPOS ESTIMULAN LAS CÉLULAS A LAS QUE SE FIJAN, TAL ES EL CASO DEL ESTIMULADOR DE LA TIROIDES DE LARGA DURACIÓN (LATS), DONDE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS SOBRE ALGÚN DETERMINANTE ANTIGÉNICO EN LA MEMBRANA DE LAS CÉLULAS TIROIDES ESTIMULA LA ACTIVIDAD CELULAR, LO QUE PRODUCIRÁ UN EXCESO EN LA SECRECIÓN DE TIROXINA. ROITT EN 1972 ARGU-

MENTA QUE ESTAS SITUACIONES CITOESTIMULATORIAS DEBEN CONSIDERARSE DENTRO DE UN NUEVO GRUPO DE REACCIONES (TIPO V), PERO GELL Y COOMBS NO LO ACEPTAN DICHIENDO QUE ÚNICAMENTE ES UNA VARIANTE DE LA DEFINICIÓN ORIGINAL DE LAS REACCIONES DEL TIPO II DONDE LO ESENCIAL ES LA SITUACIÓN DEL ANTÍGENO EN LA CÉLULA Y LA UNIÓN DEL ANTICUERPO CIRCULANTE (11).

EN LA HIPERSENSIBILIDAD DEL TIPO III SE PRODUCE DAÑO TISULAR DEBIDO A LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS ANTÍGENO-ANTICUERPO POR LO QUE TAMBIÉN SE LE LLAMA HIPERSENSIBILIDAD MEDIADA POR COMPLEJOS. AL ESTUDIAR LA ENFERMEDAD DEL SUERO, VON PIRQUET SUGIRIÓ QUE PODRÍA SER CAUSADA POR LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS ANTÍGENO-ANTICUERPO TÓXICOS Y MÁS ADELANTE SE DEMOSTRÓ QUE ESOS COMPLEJOS SON CAPACES DE INTERACTUAR CON FACTORES DEL SUERO O CÉLULAS PARA PRODUCIR UNA VARIEDAD DE CAMBIOS INFLAMATORIOS Y DEGENERATIVOS.

MAURICE ARTHUS ENCONTRÓ QUE LA INYECCIÓN INTRADÉRMICA DE ANTÍGENO SOLUBLE A CONEJOS HIPERINMUNES PRODUCÍA UNA REACCIÓN ERITEMATOSA Y EDEMATOSA ALCANZANDO UN PICO MÁXIMO DE 3 A 8 HORAS. EL COMPLEJO ANTÍGENO-ANTICUERPO FORMADO ACTIVA COMPLEMENTO LO QUE PRODUCIRÁ ANAFILOTOXINAS QUE PROVOCAN LA LIBERACIÓN DE HISTAMINA Y FACTORES QUIMIOTÁCTICOS LO QUE PRODUCE INFILTRACIÓN DE LEUCOCITOS POLIMORFONUCLEARES. ESTA REACCIÓN, LLAMADA DE ARTHUS ES DE TIPO LOCAL YA QUE AL EXISTIR UN EXCESO DE ANTICUERPO CIRCULANTE SE FORMAN COMPLEJOS MUY RÁPIDAMENTE QUE SON FÁCILMENTE RETENIDOS Y PERMANECEN EN EL SITIO DE INTRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO. UNAS 12 HORAS DESPUÉS DE LA INTRODUCCIÓN DEL ANTÍGENO SE SUSTITUYEN LOS NEUTRÓFILOS POR CÉLULAS MONONUCLEARES Y LA LESIÓN BAJA PAULATINAMENTE HASTA DESAPARECER.

CUANDO SE ADMINISTRA EL ANTÍGENO EN MAYOR CONCENTRACIÓN (EXCESO DE ANTÍGENO), SE PROVOCA LA FORMACIÓN DE COMPLEJOS SOLUBLES LOS CUALES SE MANTIENEN EN CIRCULACIÓN HASTA SER RETENIDOS O DEPOSITADOS EN DIFERENTES PARTES DEL CUERPO COMO RIÑONES, ARTICULACIONES Y PIEL. PARA QUE LOS COMPLEJOS SEAN PATOGENICOS TIENEN QUE SER DE UN TAMAÑO ADECUADO YA QUE MUY GRANDES SON DESTRUÍDOS POR LOS MACRÓFAGOS DEL SISTEMA RETICULOENDOTELIAL Y MUY PEQUEÑOS NO PRODUCEN UNA RESPUESTA INFLAMATORIA. INCLUSO LOS COMPLEJOS DE TAMAÑO ADECUADO NECESITAN DE UN CAMBIO EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR PRODUCIDO POR LA LIBERACIÓN DE SEROTONINA DE LAS PLAQUETAS QUE REACCIONAN CON COMPLEJOS DE MAYOR TAMAÑO O POR LA LIBERACIÓN DE HISTAMINA Y FACTOR DE ACTIVACIÓN PLAQUETARIA EN UNA RESPUESTA MEDIADA POR IGE. LOS COMPLEJOS EN ESTAS CONDICIONES SE DEPOSITAN, COMO SE MENCIONÓ, EN DIFERENTES VASOS SANGUÍNEOS PRINCIPALMENTE LOS DE LA CIRCULACIÓN DE INTERCAMBIO, QUE SE ENCUENTRAN EN PIEL, PLEXOS COROIDES, ARTICULACIONES Y RIÑONES.

LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD DEL TIPO IV LLAMADA HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA O MEDIADA POR CÉLULAS FUÉ RECONOCIDA POR KOCH EN 1890 AL OBSERVAR QUE LOS BACILOS TUBERCULOSOS VIABLES INOCULADOS SUBCUTANEAMENTE A UN COBAYO PRODUCEN UNA REACCIÓN INFLAMATORIA MUCHO MÁS INTENSA EN LOS ANIMALES PREVIAMENTE INFECTADOS QUE EN LOS ANIMALES NO INOCULADOS CON ANTERIORIDAD. MÁS ADELANTE SE OBSERVÓ QUE UN PRODUCTO SOLUBLE RELATIVAMENTE PURIFICADO DE LOS BACILOS (DERIVADO PROTEICO PURIFICADO), CAUSABA LA MISMA REACCIÓN ENTRE 24 Y 72 HORAS DESPUÉS DE SER INOCULADO, PRODUCIÉNDOSE INFLAMACIÓN Y ERITEMA. ÉSTE TIPO DE HIPERSENSIBILIDAD SE ENCUENTRA EN MUCHAS REACCIONES ALÉRGICAS A BACTERIAS, VIRUS Y HONGOS, ADEMÁS DEL RECHAZO

A TEJIDO TRANSPLANTADO Y LAS DERMATITIS POR CONTACTO QUE RESULTAN DE LA SENSIBILIZACIÓN A CIERTAS SUSTANCIAS QUÍMICAS QUE REACCIONAN COMO HAPTENOS. LOS ANTÍGENOS QUE DESPIERTAN ESTE TIPO DE RESPUESTA SON RECONOCIDOS POR LOS LINFOCITOS CERCA DEL SITIO DE ENTRADA, LO QUE PROVOCA LA ACTIVACIÓN DE ESTAS CÉLULAS Y LA SUBSECUENTE PRODUCCIÓN DE UN GRAN NÚMERO DE FACTORES ESPECÍFICOS LLAMADOS LINFOCINAS. ALGUNAS LINFOCINAS ATRAEN Y ACTIVAN MONOCITOS Y NEUTROFILOS. LAS CÉLULAS POLIMORFONUCLEARES MIGRAN RÁPIDAMENTE FUERA DE LA LESIÓN DEJANDO UN INFILTRADO DE LINFOCITOS Y MONOCITOS LO QUE CONTRASTA CON EL CARÁCTER POLIMORFONUCLEAR DE LA REACCIÓN DE ÁRTHUS. ESTE TIPO DE REACCIONES NO PRODUCE UN CAMBIO SIGNIFICATIVO EN LA PERMEABILIDAD VASCULAR POR LO QUE LA LESIÓN QUE SE PRODUCE ES DURA CON LIGERO EDEMA. LOS MACRÓFAGOS QUE SE ACUMULAN EN EL SITIO DE LA INFLAMACIÓN Y QUE HAN SIDO ACTIVADOS CON LINFOCINAS, TIENDEN A CAUSAR UNA DESTRUCCIÓN TISULAR NO ESPECÍFICA E INFLAMACIÓN, YA SEA DIRECTA O POR LA LIBERACIÓN DE SUS PROPIAS MONOCINAS.

CUANDO SE PRESENTA UNA ESTIMULACIÓN CRÓNICA LOCALIZADA, HAY UNA ALTA CONCENTRACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES ENTRE LAS FIBRAS DE TEJIDO CONECTIVO Y UN NÚMERO VARIABLE DE LINFOCITOS, CÉLULAS PLASMÁTICAS, EOSINÓFILOS Y NEUTROFILOS JUNTO CON DEPÓSITOS DE CALCIO, LOS FIBROBLASTOS SINTETIZAN COLÁGENO QUE RODEA A LAS CÉLULAS, LO QUE PRODUCE UN GRANULOMA COMO UN INTENTO DEL ORGANISMO DE AISLAR EL SITIO DE LA INFECCIÓN.

UN FENÓMENO ASOCIADO A LA HIPERSENSIBILIDAD RETARDADA ES LA CITOTOXICIDAD DE LAS CÉLULAS T ACTIVADAS POR ANTÍGENOS QUE SE PRESENTAN EN LA SUPERFICIE DE CÉLULAS, YA SEA INFECTADAS POR VIRUS, ANTÍGENOS CODIFICADOS POR EL GEN DEL

COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD Y ANTÍGENOS ASOCIADOS A TUMORES. ESTOS ANTÍGENOS ESTIMULAN LA PRODUCCIÓN DE LINFOCITOS T CITOTÓXICOS (CTL), LOS CUALES SOLO LISAN AQUELLAS CÉLULAS PORTADORAS DE ANTÍGENO CON TAL DE QUE PORTEN EL MISMO ANTÍGENO DEL COMPLEJO MAYOR DE HISTOCOMPATIBILIDAD QUE LA CÉLULA CITOTÓXICA EN SU SUPERFICIE (30).

RECIENTEMENTE SE HA DESCRITO UN NUEVO MECANISMO DE HIPERSENSIBILIDAD, DONDE SE PRODUCE LA INCORPORACIÓN DE ANTICUERPO CIRCULANTE A LA CÉLULA A TRAVÉS DE RECEPTORES DE Fc EN LA MEMBRANA CELULAR, CON INTRODUCCIÓN DEL ANTICUERPO Y UNIÓN A ANTÍGENOS INTRACELULARES. ESTOS FENÓMENOS SIN EMBARGO, NO HAN SIDO REPRODUCIDOS EN ALGUNOS LABORATORIOS Y NO SON UNIVERSALMENTE ACEPTADOS (1).

2. NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD.

LAS ENFERMEDADES RESPIRATORIAS ASOCIADAS A LA INHALACIÓN DE POLVOS ORGÁNICOS SON CONOCIDAS DESDE QUE RAMAZZINI EN 1713 DESCRIBIÓ EPISODIOS RECURRENTE DE TOS Y DIFICULTAD PARA RESPIRAR EN PERSONAS QUE ESTABAN EXPUESTAS AL POLVO DE GRANOS DE CEREALES SOBRECALENTADOS (51), PERO NO FUÉ SINO HASTA 1932 EN QUE CAMPBELL DESCRIBIÓ PROPIAMENTE UNA NEUMONITIS LLAMADA PULMÓN DEL GRANJERO CON TODAS SUS CARACTERÍSTICAS (33). ACTUALMENTE SE HAN DESCRITO UN GRAN NÚMERO DE ENFERMEDADES PULMONARES DEBIDAS A LA INHALACIÓN DE DIVERSOS POLVOS ORGÁNICOS A LA VEZ QUE SE HAN DESCRITO LOS AGENTES CAUSALES QUE ACTÚAN COMO ANTÍGENOS, ENTRE LOS QUE SE CUENTAN HONGOS, BACTERIAS Y PROTEÍNAS ANIMALES PRESENTES EN EXCRETAS DE AVES Y ROEDORES. LA TABLA #1 ENLISTA ALGUNAS DE ESTAS ENFERMEDADES CUYO NOMBRE REFLEJA LAS CONDICIONES EPIDEMIOLÓGICAS EN LAS CUALES SE DESARROLLA.

TABLA # 1

ETIOLOGIA DE LA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD

ANTIGENO	FUENTE DE ANTIGENO	ENFERMEDAD
M. FAENI	PAJA HÚMEDA	PULMÓN DEL GRANJERO
Á. FUMIGATUS	MOHOS	ASPERGILOSIS
A. CLAVATUS	MOHOS	TRABAJADOR DE MALTA
T. VULGARIS	CAÑA DE AZÚCAR	BAGASOSIS
T. ACTINOMICETES	MOHOS	PULMÓN DE OFICINISTA
C. CORTICALE	POLVO DE CORCHO	SUBEROSIS
A. PULLULANS	MOHOS EN LEÑA DE MAPLE	ENF. DE DECORTICADOR DE MAPLE
ALTERNARIA	MOHOS EN MADERA ASERRADA	SEQUIOISIS
M. FAENI	MADERA MOHOSA	ENF. DE TRABAJADOR DE PULPA
T. VULGARIS	ABONO PARA HONGOS	ENF. DEL RECOLECTOR DE HONGOS
PENICILLIUM	QUESO MOHOSO	ENF. DEL LAVADOR DE QUESO
S. GRANARIUS	HARINA CON GORGOJOS	ENF. POR GORGOJO
B. SUBTILIS	MANUFACTURA DE DETERGENTE	ENF. DEL DETERGENTE
¿POLVO ORGÁNICO?	POLVO DE CAFÉ	ENF. DEL PRODUCTOR DE CAFÉ
¿POLVO ORGÁNICO?	POLVO DE MAÍZ (TAMO)	ENF. DEL PROD. DE NIXTAMAL
¿POLVO ORGÁNICO?	PIELES	ENF. DEL PELETERO
¿POLVO ORGÁNICO?	TECHOS DE PALMA	PULMÓN DE NUEVA GUINEA
PROTEÍNA PORCINA	HIPÓFISIS DESECADA	P. DE INHALACIÓN DE PITUITARIA
SUERO DE PALOMA	POLVO DE HECES	P. DE CRIADOR DE PALOMAS

ESTAS ENFERMEDADES PUEDEN SER AGRUPADAS BAJO EL TÉRMINO GENERAL DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD O ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA (AAE) YA QUE COMPARTEN UNA INMUNOPATOGENÉISIS COMÚN INDEPENDIENTEMENTE DE LA FUENTE DEL INMUNOGENO.

LA RESPUESTA CLÍNICA AL CONTACTO CON EL AGENTE INMUNOGENICO DEPENDE DE LOS SIGUIENTES FACTORES: 1) LA REACTIVIDAD INMUNOLÓGICA DEL SUJETO, 2) LA NATURALEZA DEL POLVO ORGÁNICO INHALADO, COMO EL TAMAÑO DE LAS PARTÍCULAS Y 3) LAS CIRCUNSTANCIAS DE EXPOSICIÓN. ESTAS ENFERMEDADES OCURREN GENERALMENTE EN INDIVIDUOS NO ATÓPICOS EN QUIENES LOS ANTÍGENOS PRESENTES EN LOS POLVOS ORGÁNICOS ESTIMULAN LA PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS Y PRODUCEN UN LENTO DESARROLLO DE REACCIONES INFLAMATORIAS DEL PULMÓN. ÉSTE TIPO DE REACCIONES FUERON CONSIDERADAS INICIALMENTE COMO PERTENECIENTES AL TIPO III DE REACCIONES DE HIPERSENSIBILIDAD DE LA CLASIFICACIÓN DE GELL Y COOMBS, PERO POCO A POCO SE HA VISTO QUE LAS REACCIONES QUE SE DESENCADENAN EN UN INDIVIDUO SUSCEPTIBLE SON MUCHO MÁS COMPLEJAS.

EXISTEN EVIDENCIAS QUE APOYAN CADA UNO DE LOS CUATRO MECANISMOS DE DAÑO INMUNOLÓGICO EN LA PATOGENÉISIS DE LA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD POR LO QUE SE HA PENSADO QUE ÉSTE NO DEPENDE DE UN SÓLO TIPO DE REACCIÓN SINO QUE ES UNA COMBINACIÓN DE ELLAS, PREDOMINANTEMENTE DEL TIPO III Y IV.

LA PRINCIPAL EVIDENCIA DE LA REACCIÓN DEL TIPO III ES LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS PRECIPITANTES, EN SU MAYORÍA IgG (21,9) FIJADORES DE COMPLEMENTO "IN VITRO" (9), QUE DECAEN AL CESAR LA EXPOSICIÓN AL ANTÍGENO (19), ADEMÁS EXISTE UNA RESPUESTA CUTÁNEA SIMILAR A LA REACCION DE ARTHUS

QUE APARECE ENTRE LAS 4-6 HORAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN DEL ANTÍGENO, CON INFILTRACIÓN INICIAL DE NEUTRÓFILOS, SEGUIDA DE AGLOMERACIÓN DE CÉLULAS MONONUCLEARES. EL ESTADO CLÍNICO QUE PRESENTA EL PACIENTE AL HACERLE INHALAR EXPERIMENTALMENTE EL INMUNÓGENO SE ASEMEJA A LA REACCIÓN DEL TIPO III POR LO QUE TAMBIÉN SE CONSIDERA EVIDENCIA A FAVOR DE ÉSTA.

LA INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS SE HA ACEPTADO COMO MECANISMO PATOGENICO DE LA ENFERMEDAD YA QUE SE HA DEMOSTRADO LA PRODUCCIÓN DEL FACTOR DE INHIBICIÓN DE LA MIGRACIÓN DE MACRÓFAGOS O DE TRANSFORMACIÓN BLASTOIDE DE LINFOCITOS POR ESTIMULACIÓN CON ANTÍGENOS Y ESTUDIOS DE TRANSFERENCIA PASIVA DE CÉLULAS DE NÓDULO LINFÁTICO DE ANIMALES SENSIBILIZADOS (52).

LA COMBINACIÓN DE LA INMUNIDAD MEDIADA POR CÉLULAS A NIVEL PULMONAR JUNTO CON LA PRODUCCIÓN DE LA REACTIVIDAD PERIFÉRICA Y LA INHALACIÓN DEL ANTÍGENO PRODUCIRÁN LESIONES PULMONARES COMO ALVEOLITIS, GRANULOMAS Y CAMBIOS FIBRÓTICOS DE ACUERDO A LA INTENSIDAD Y FRECUENCIA DE LA EXPOSICIÓN AL ANTÍGENO, LO QUE DETERMINARÁ LAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE LA ENFERMEDAD AGUDA O CRÓNICA.

LA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD AGUDA SE PRESENTA 4-6 HORAS DESPUÉS DE UNA BREVE E INTENSA EXPOSICIÓN AL ANTÍGENO Y ES SIMILAR A NEUMONITIS AGUDAS DEBIDAS A VIRUS O BACTERIAS. LOS PACIENTES PUEDEN PRESENTAR FIEBRE, ESCALOFRIOS, MALESTAR GENERAL, ANOREXIA, NÁUSEAS, DOLOR DE CABEZA, COMPRESIÓN DE PECHO, TOS NO PRODUCTIVA Y DISNEA, ADEMÁS DE CIANOSIS QUE OCURRE EN CASOS SEVEROS, TAQUICARDIA Y TAQUIPNEA. LOS SÍNTOMAS DESAPARECEN 12-18 HORAS DESPUÉS DE LA EXPOSICIÓN AL CESAR EL CONTACTO. UNA EX-

POSICIÓN MENOS INTENSA AL ANTÍGENO POR UN LARGO PERÍODO PUEDE PRODUCIR LA FORMA CRÓNICA DE LA ENFERMEDAD PRESENTÁNDOSE TOS INCIDIOSA, DISNEA DE ESFUERZO, ANOREXIA, PÉRDIDA DE PESO Y FATIGA HASTA UNA FIBROSIS INTERSTICIAL DIFUSA E INSUFICIENCIA RESPIRATORIA Y SI LA ENFERMEDAD NO SE RECONOCE, EL DAÑO PULMONAR PUEDE SER IRREVERSIBLE.

EL PROCESO PATOLÓGICO BÁSICO ES UNA NEUMONITIS GRANULOMATOSA EN LA QUE HAY INFILTRACIÓN TEMPRANA DE LAS PAREDES ALVEOLARES CON PREDOMINANTES LINFOCITOS, PERO TAMBIÉN ESTÁN PRESENTES MUCHAS CÉLULAS PLASMÁTICAS. PUEDEN VERSE GRANDES HISTIOCITOS Y CÉLULAS PLASMÁTICAS EN ESPACIOS ALVEOLARES, SIN EMBARGO LA REACCIÓN ES PREDOMINANTEMENTE INTERSTICIAL.

3. ENFERMEDAD DEL CRIADOR DE PALOMAS.

LA ENFERMEDAD DEL CRIADOR DE PALOMAS ES UN EJEMPLO DE ESTE TIPO DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD, DONDE EXISTE PRODUCCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA QUE SON EXCRETADAS EN HECEAS Y PLUMAS (6).

ESTA ENFERMEDAD FUÉ IDENTIFICADA POR REED EN 1965 (45) EN PACIENTES QUE PRESENTABAN MUCHOS EPISODIOS DE NEUMONITIS INTERSTICIAL AGUDA DESPUÉS DE EXPONERSE A PALOMAS. ÉSTOS PACIENTES REPRODUJERON UN EPISODIO DE LA ENFERMEDAD AL SER EXPUESTOS A PLUMAS O AEROSOLAS DE EXCRETAS O SUERO DE PALOMAS EN EL LABORATORIO Y PRESENTARON ANTICUERPOS CONTRA EXTRACTOS DE ESTOS MISMOS PRODUCTOS.

EN ESTUDIOS REALIZADOS CON EXTRACTOS DE HECEAS DE PALOMA SE ENCONTRARON DIFERENTES FRACCIONES ANTIGÉNICAS DE LAS CUALES DOS ERAN GLUCOPROTEÍNAS DERIVADAS DEL SUERO QUE CRU-

ZABAN CON LA FRACCIÓN GAMMAGLOBULÍNICA. ASÍ SE DEMOSTRÓ QUE LA MAYOR DE ELLAS DE PESO MOLECULAR CERCANO A 200 000 DALTONS Y QUE ES ENCONTRADA EN LAS SECRESIONES DE LAS PALOMAS CORRESPONDE A IGA, MIENTRAS QUE LA FRACCIÓN ANTIGÉNICA MENOR DERIVADA DEL SUERO, DE PESO MOLECULAR DE 42 000 CORRESPONDE AL FRAGMENTO FAB O Fc DE LA MISMA IGA (26).

4. METODOS UTILIZADOS PARA LA DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTIPROTEINAS DEL SUERO DE PALOMAS.

DESDE QUE LA ENFERMEDAD DEL CRIADOR DE PALOMAS FUÉ DESCRITA SE USAN ESTUDIOS SEROLÓGICOS PARA DETERMINAR LA RESPUESTA INMUNE ASOCIADA A LA ENFERMEDAD. INICIALMENTE SE DEMOSTRÓ LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS PRECIPITANTES CONTRA PROTEÍNAS DEL SUERO, EXCRETAS, PLUMAS Y HUEVO DE PALOMA, POR INMUNODIFUSIÓN DOBLE (IDD) Y POR INMUNOELECTROFORÉISIS (IEF) (6). ESTOS MÉTODOS AUNQUE HAN SIDO USADOS EN EL ESTUDIO DE LAS FRACCIONES PROTEICAS QUE ACTÚAN COMO ANTÍGENOS, SON DE BAJA SENSIBILIDAD Y CONSUMEN MUCHO TIEMPO.

LA CONTRAINMUNOELECTROFORÉISIS (CIEF) USA EL MISMO PRINCIPIO (ANTICUERPO PRECIPITANTE) PERO AL FAVORECER LA REACCIÓN ANTÍGENO-ANTICUERPO MEDIANTE MIGRACIÓN ELECTROFÓRETICA, PERMITE AUMENTAR LA SENSIBILIDAD POR UN FACTOR DE 100 Y REDUCE EL TIEMPO PARA LA LECTURA DE LA PRUEBA, ESTE MÉTODO SE USA RUTINARIAMENTE EN EL LABORATORIO (46).

LA HEMAGLUTINACIÓN PASIVA ES UNA TÉCNICA MUY SENSIBLE QUE TAMBIÉN HA SIDO UTILIZADA (20), PERO PRESENTA ALGUNOS PASOS COMPLEJOS Y REQUIERE DE ADSORCIÓN PREVIA DEL SUERO PROBLEMA CON ERITROCITOS DE CARNERO DE MODO QUE AUNQUE LA PRUEBA EN SÍ ES RÁPIDA, LA PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS NECESITA VARIOS DÍAS Y HABILIDAD TÉCNICA (46). NOSOTROS

HEMOS ADAPTADO LA TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS DE CLASE IGG PRECIPITANTES O NO, CON RESULTADOS FAVORABLES.

5. ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO (ELISA).

LOS MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS QUE CONJUGAN AL ANTÍGENO O AL ANTICUERPO A ENZIMAS HAN SIDO USADOS POR MUCHOS INVESTIGADORES PARA LA LOCALIZACIÓN DE ANTÍGENOS O ANTICUERPOS EN CORTES DE TEJIDOS, EN IEF E IDD (2). EN BASE A ESTO, ENGVALL Y PERLMAN DESARROLLARON UN MÉTODO CUANTITATIVO POR COMPETENCIA PARA LA DETERMINACIÓN DE PEQUEÑAS CANTIDADES (NANOGRAMOS/MILILITRO) DE ANTÍGENO EN SOLUCIÓN USANDO FOSFATASA ALCALINA CONJUGADA A IGG PURIFICADA (16). VAN WEEMEN & SCHURS DESCRIBIERON UNA TÉCNICA SIMILAR PARA LA DETERMINACIÓN DE GONADOTROPINA CORIÓNIC HUMANA USANDO PEROXIDASA PARA MARCAR EL ANTÍGENO (55). EN ESTOS ENSAYOS LOS REACTIVOS NO PRESENTAN NINGÚN RIESGO, SON ESTABLES Y DE LARGA DURACIÓN. LOS RESULTADOS PUEDEN SER CUALITATIVOS DE ACUERDO A LA APRECIACIÓN VISUAL DE LA COLORACIÓN PRODUCIDA EN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA O CUANTITATIVOS CON EL USO DE UN ESPECTROFOTÓMETRO SIMPLE (58).

LOS MÉTODOS INMUNOENZIMÁTICOS PUEDEN SER DE DOS TIPOS, HOMOGÉNEOS Y HETEROGÉNEOS. EN LOS PRIMEROS UNA ENZIMA ES CONJUGADA A UN HAPTENO QUE AL REACCIONAR CON EL ANTICUERPO ALTERA LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA. LA VENTAJA DE ESTE TIPO DE ENSAYOS ES QUE NO REQUIEREN DE FASE SÓLIDA PARA LA SEPARACIÓN DE LO UNIDO AL ANTICUERPO Y LO LIBRE, PERO ÚNICAMENTE FUNCIONA CON SUSTANCIAS DE BAJO PESO MOLECULAR. EL MÉTODO HETEROGÉNEO SE BASA EN LA UTILIZACIÓN DE UNA FASE SÓLIDA CON EL FIN DE SEPARAR EL ANTÍGENO O ANTICUERPO ESPECÍFICO (MARCADO CON ENZIMA) QUE PARTICIPÓ EN LA REACCIÓN ANTÍGENO-

ANTICUERPO DE AQUEL QUE QUEDÓ LIBRE SIN REACCIONAR (59). EN ESTE MÉTODO, CONOCIDO COMO ELISA (ENZYME-LINKED-IMMUNOSORBENT ASSAY), EL ANTÍGENO O ANTICUERPO SE PUEDE ADHERIR A UN MATERIAL PARTICULADO (QUE ACTÚA COMO FASE SÓLIDA) COMO CELULOSA Y POLIACRILAMIDA O TUBOS, DISCOS, ESFERAS, MICROPLACAS HECHAS DE NYLON, POLIESTIRENO, POLIVINILO O POLIPROPILENO.

LA ENZIMA UTILIZADA DEBE TENER UNA ALTA ACTIVIDAD, DEBE SER BARATA Y FÁCIL DE OBTENERLA PURA, ADEMÁS DE QUE LA REACCIÓN QUE CATALICE SEA FÁCIL DE MEDIR ESPECTROFOTOMÉTRICAMENTE.

LAS ENZIMAS QUE CUMPLEN ESTOS REQUISITOS SON ENTRE OTRAS: PEROXIDASA, LACTOPEROXIDASA, GLUCOSAOXIDASA, BETA-GALACTOSIDASA Y FOSFATASA ALCALINA, LAS CUALES SON CONJUGADAS A ANTÍGENOS O ANTICUERPOS POR DIFERENTES MÉTODOS (31). INICIALMENTE FUERON UTILIZADOS PARA LA CONJUGACIÓN, REACTIVOS COMO EL CLORURO DE CIANÓGENO, EL 4,4'-DIFLUORO-3,3'-DINITRO-DIFENIL SULFONA, TOLUENO-2,2'-DIISOCIANATO, N,N'-DICICLOHEXILCARBODIIMIDA, 1-(3-DIMETILAMINOPROPIL)-3-ETILCARBODIIMIDA Y O-DIANICIDINA BIS DIAZOADA, LOS CUALES TENÍAN VARIAS DESVENTAJAS Y NINGUNO SE UTILIZA ACTUALMENTE.

EN 1969 AVRAMEAS REPORTÓ EL USO DE GLUTARALDEHÍDO COMO AGENTE BIFUNCIONAL EN LA CONJUGACIÓN DE ENZIMAS CON IGG HUMANA, DE CONEJO Y DE CARNERO (2). ESTUDIOS POSTERIORES DEMOSTRARON QUE LOS CONJUGADOS PREPARADOS POR ESTE MÉTODO LLAMADO DE UN SÓLO PASO, SE POLIMERIZAN EN EXCESO Y SÓLO UNA PEQUEÑA PORCIÓN DE ENZIMA SE CONJUGA CON IGG POR LA ALTA REACTIVIDAD DEL GLUTARALDEHÍDO CON ÉSTA (25) Y AÚN CUANDO LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA SE RETIENE EN EL CONJUGADO, LA ACTIVIDAD DEL ANTICUERPO DISMINUYE (4). PARA EVITAR ESTA DESVENTAJA SE UTILIZA EL MÉTODO DEL GLUTARALDEHÍDO DE DOS PASOS CITADO POR ENGVALL Y PERLMAN CON FOSFATASA ALCALINA (15)

Y DESCRITA POR AVRAMEAS Y TERNYNCK EN EL MISMO AÑO CON PEROXIDASA (4). CON ESTE MÉTODO EL CONJUGADO RETIENE MAYOR ACTIVIDAD QUE CON EL MÉTODO DE UN SÓLO PASO.

EL MÉTODO DEL PERYODATO (38) ELIMINA EL USO DE AGENTES BIFUNCIONALES YA QUE SE BASA EN LA OXIDACIÓN DE LOS GRUPOS -OH DE ENZIMAS QUE CONTIENEN CARBOHIDRATOS COMO PEROXIDASA, A GRUPOS ALDEHÍDO CON PERYODATO DE SODIO, LOS CUALES REACCIONAN DIRECTAMENTE CON GRUPOS ALFA Y EPSILON AMINO DE LOS ANTICUERPOS FORMANDO UNA BASE DE SCHIFF QUE SE ESTABILIZA CON NABH_4 . PARA EVITAR LA AUTOCONJUGACIÓN, LOS GRUPOS ALFA Y EPSILON AMINO DE LA PEROXIDASA SE BLOQUEAN CON FLUORODINITRO BENCENO. LA DESVENTAJA DE ESTE MÉTODO ES QUE SÓLO SE APLICA A ENZIMAS QUE CONTIENEN CARBOHIDRATOS Y QUE SU ACTIVIDAD NO DEPENDA DE ÉSTOS.

EXISTEN OTROS MÉTODOS DE CONJUGACIÓN EN LOS QUE SE USAN DERIVADOS DE LA MALEIMIDA, DERIVADOS DEL DISULFURO DE PIRIDILO, P-BENZOQUINONA, ÁCIDO YODOACÉTICO O YODOACETAMIDA (31), QUE APROVECHAN LA PRESENCIA DE GRUPOS SULFHIDRILO Y AMINO DE LAS PROTEÍNAS.

ACTUALMENTE NINGÚN MÉTODO SE HA CONSIDERADO COMO ÓPTIMO AUNQUE SE DICE QUE EL DE LA MALEIMIDA ES EL QUE PRESENTA MAYORES VENTAJAS (31), PERO EL MÉTODO DEL GLUTARALDEHÍDO ES EL QUE HA TENIDO MAYOR DIFUSIÓN YA QUE ES UN MÉTODO MUY SIMPLE Y RÁPIDO. EN ESTA REACCIÓN DEL GLUTARALDEHÍDO CON LA PROTEÍNA EL SITIO MÁS PROBABLE DE INTERACCIÓN ENTRE ELLOS ES EL GRUPO DE LISINA, PERO SE CONOCE POCO ACERCA DE ESTE MECANISMO. PARTE DE LA DIFICULTAD HA SIDO QUE LA ESTRUCTURA DEL REACTIVO EN SOLUCIÓN PUEDE NO SER LA DE UN SIMPLE DIALDEHÍDO. SE HA DEMOSTRADO QUE SE POLIMERIZA PRODUCIENDO ALGUNA DE LAS SIGUIENTES ESTRUCTURAS (43):

5.1 PRINCIPIO DEL METODO DE ELISA.

EXISTEN DIFERENTES MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN YA SEA DE ANTICUERPOS O DE ANTÍGENOS POR LA TÉCNICA DE ELISA. EL MÉTODO INDIRECTO ES AMPLIAMENTE USADO PARA DETERMINAR ANTICUERPOS, YA QUE EL CONJUGADO UTILIZADO (ANTI-INMUNOGLOBULINA HUMANA MARCADA CON ENZIMA) PUEDE RECONOCER ANTICUERPOS, LOS CUALES PUEDEN ESTAR DIRIGIDOS CONTRA UNA GRAN VARIEDAD DE ANTÍGENOS. LOS POZOS DE UNA PLACA DE POLIESTIRENO QUE ACTÚAN COMO FASE SÓLIDA SE RECUBREN POR ADSORCIÓN PASIVA CON EL ANTÍGENO Y DESPUÉS DE UN TIEMPO DE INCUBACIÓN SE LAVAN. LAS MUESTRAS PROBLEMA QUE DEBEN CONTENER AL ANTICUERPO ESPECÍFICO SE ADICIONAN A LOS POZOS, SE INCUBA Y LAVA NUEVAMENTE. EL ANTICUERPO QUEDA INMOVILIZADO POR UNIÓN AL ANTÍGENO ADSORBIDO A LA PLACA. SE AÑADE ANTI-INMUNOGLOBULINA HUMANA MARCADA CON ENZIMA Y SE INCUBA, LO QUE PERMITE SU UNIÓN CON EL ANTICUERPO CAPTURADO. EL EXCESO DE REACTIVO SE LAVA. SE AÑADE EL SUSTRATO DE LA ENZIMA Y SE INCUBA DURANTE UN TIEMPO DETERMINADO. LA DEGRADACIÓN DEL SUSTRATO SE INDICA POR LA INTENSIDAD DE COLOR PRODUCIDO, EL CUAL ES PROPORCIONAL A LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPO EN LA MUESTRA. LA REACCIÓN ENZIMÁTICA SE DETIENE Y LA MEDICIÓN SE HACE VISUAL O CON AYUDA DE UN ESPECTROFOTÓMETRO. FIG. 1.

TAMBIÉN EXISTEN DETERMINACIONES POR COMPETENCIA TANTO DEL ANTÍGENO COMO DEL ANTICUERPO, LOS CUALES SON DE TIPO DIRECTO, YA QUE EL ANTÍGENO O EL ANTICUERPO ESPECÍFICO SE CONJUGAN DIRECTAMENTE CON LA ENZIMA. EN ESTE CASO EL ANTÍGENO O ANTICUERPO MARCADOS CON ENZIMA SE ADICIONAN AL MISMO TIEMPO QUE EL ANTÍGENO O ANTICUERPO DE LA MUESTRA DESCONOCIDA, POR LO QUE EXISTIRÁ COMPETENCIA PARA UNIRSE AL ANTICUERPO O ANTÍGENO FIJADO AL POZO, SE LAVA PARA ELIMINAR EL EXCESO Y SE ADICIONA EL SUSTRATO Y LA DIFERENCIA DE LA DEGRADACIÓN ENTRE EL CONJUGADO ÚNICAMENTE Y EL CONJUGADO MAS LA MUES

TRA ES PROPORCIONAL A LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENO O ANTICUERPO. FIG. 2 Y FIG. 3.

OTROS MÉTODOS PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTÍGENO SON LOS DE INHIBICIÓN Y LOS DEL "SANDWICH" DE DOS ANTICUERPOS. EN EL PRIMERO, EL ANTÍGENO QUE PUEDE ESTAR PRESENTE EN EL PROBLEMA REACCIONA CON SU ANTICUERPO MARCADO CON LA ENZIMA, EL CUAL YA NO PUEDE REACCIONAR CON EL ANTÍGENO QUE SE ENCUENTRA FIJADO A LA FASE SÓLIDA. EN CASO DE NO EXISTIR ANTÍGENO EN EL PROBLEMA, EL ANTICUERPO MARCADO CON LA ENZIMA REACCIONARÁ CON EL ANTÍGENO FIJADO A LA FASE SÓLIDA Y AL ADICIONARSE SUSTRATO HABRÁ PRODUCCIÓN DE COLOR, EL CUAL ES INVERSAMENTE PROPORCIONAL A LA CONCENTRACIÓN DE ANTÍGENO. FIG. 4. EN EL SEGUNDO, EL ANTICUERPO ESPECÍFICO PARA EL ANTÍGENO QUE SE BUSCA, SE FIJA A LA FASE SÓLIDA Y SE HACE REACCIONAR CON EL PROBLEMA EN DONDE SE INVESTIGA EL ANTÍGENO, DE ESTAR ÉSTE PRESENTE, SE PEGA AL ANTICUERPO ADHERIDO Y ENTONCES SE ADICIONA ANTICUERPO MARCADO CON ENZIMA (EL MISMO ANTICUERPO QUE EL USADO PARA FIJARSE A LA FASE SÓLIDA), QUE RECONOCE AL ANTÍGENO Y SE FIJA A ÉL. AL ADICIONAR EL SUSTRATO SE PRODUCIRÁ COLOR, EL CUAL ES PROPORCIONAL A LA CANTIDAD DE ANTÍGENO (59,58). FIG. 5.

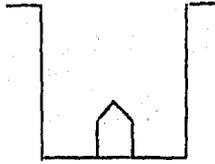
5.2 APLICACION DEL METODO DE ELISA.

EN PRINCIPIO, ESTE MÉTODO PUEDE SER USADO PARA LA DETERMINACIÓN DE CUALQUIER ANTICUERPO SI SE LOGRA ADHERIR SATISFACTORIAMENTE EL ANTÍGENO APROPIADO A UNA FASE SÓLIDA. DE ESTA MANERA SE HAN LOGRADO DETERMINAR TANTO ANTÍGENOS COMO ANTICUERPOS EN LAS ÁREAS DE ENDOCRINOLOGÍA (HCG, HORMONA LUTEALIZANTE Y ESTRÓGENOS), INMUNOPATOLOGÍA (IGG, DNA EN LUPUS ERYTEMATOSO, IGE EN ESTADOS DE HIPERSENSIBILIDAD), HEMATOLOGÍA (ANTÍGENO RELACIONADO AL FACTOR VIII EN PLASMA), MICROBIOLO-

GÍA (ANTICUERPOS ANTI-E. COLI, ANTI-BRUCELLA, ANTI-TREPONEMA, ANTI-RUBEOLA, ANTI-HERPES, ETC.), Y PRINCIPALMENTE PARASITOLOGÍA (TRIPANOSOMIASIS, TOXOPLASMOSIS, ETC.) (7).

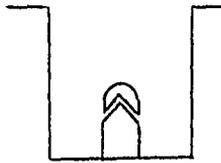
LAS VENTAJAS DE ELISA INCLUYEN BAJO COSTO, ESTABILIDAD DE REACTIVOS, SEGURIDAD, SENSIBILIDAD Y FÁCIL MANEJO, PERO ES IMPORTANTE PARA LA REPRODUCIBILIDAD DE LA PRUEBA, TENER CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS EN CADA ENSAYO, COMPROBAR LA ACTIVIDAD TANTO ENZIMÁTICA COMO INMUNOLÓGICA DEL CONJUGADO Y PROBAR QUE LA FASE SÓLIDA Y LOS REACTIVOS PARA RECUBRIRLA FUNCIONEN.

1. AG ADSORBIDO A LA PLACA



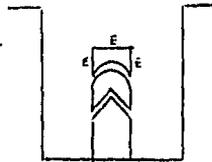
LAVADO

2. ADICIÓN DEL AC QUE SE UNE AL AG



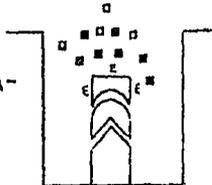
LAVADO

3. ANTI-INMUNOGLOBULINA MARCADA CON ENZIMA, SE PEGA AL AC



LAVADO

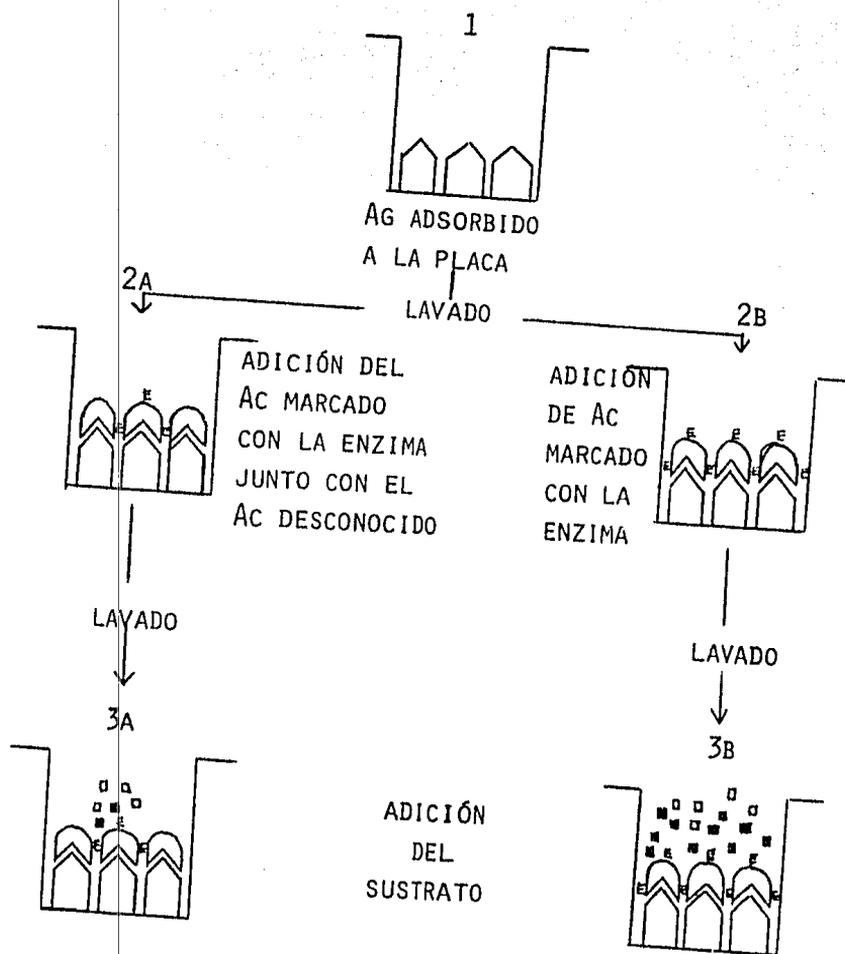
4. ADICIÓN DE SUSTRATO



PRODUCCIÓN DE COLOR

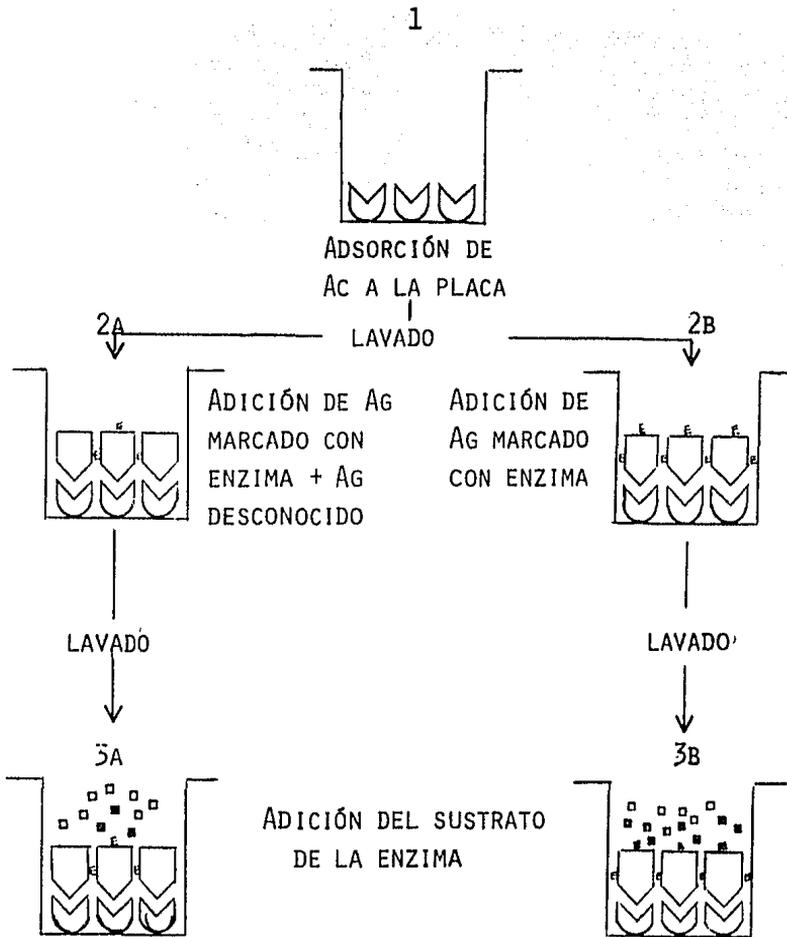
HIDRÓLISIS DE SUSTRATO=[Ac]

FIG. 1 MÉTODO INDIRECTO DE ELISA PARA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS.



HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO=[ANTICUERPO MARCADO]
 DIFERENCIA ENTRE 3A Y 3B=[ANTICUERPO DESCONOCIDO]

FIG. 2 MÉTODO COMPETITIVO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTI-CUERPOS.



HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO=[ANTÍGENO MARCADO]
DIFERENCIA ENTRE 3A Y 3B=[ANTÍGENO DESCONOCIDO]

FIG. 3 MÉTODO COMPETITIVO PARA DETERMINACIÓN DE ANTÍGENOS

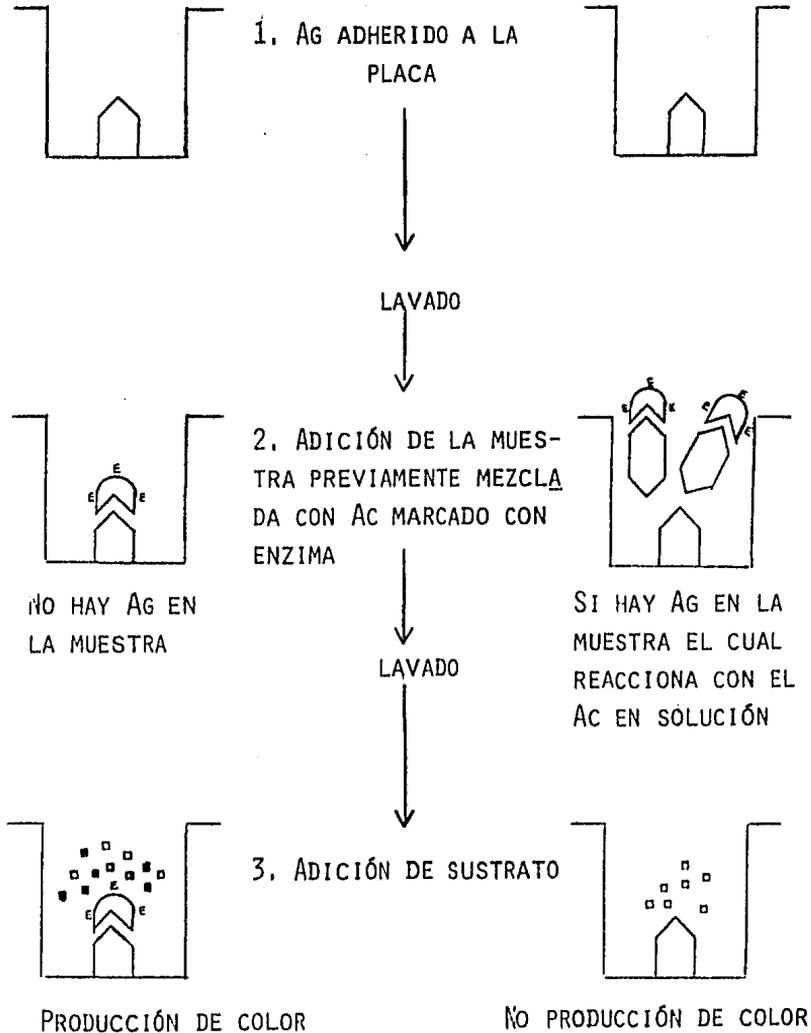
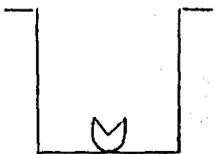


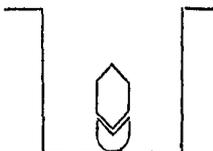
FIG. 4 MÉTODO POR INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN DE ELISA

1. AC ADSORBIDO A LA PLACA



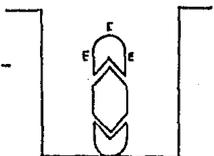
LAVADO

2. SOLUCIÓN PROBLEMA CON ANTÍGENO



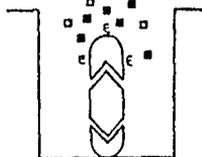
LAVADO

3. ADICIÓN DE AC ESPECÍFICO MARCADO CON ENZIMA



LAVADO

4. ADICIÓN DEL SUSTRATO DE LA ENZIMA



HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO=[ANTÍGENO]

FIG. 5 MÉTODO DEL "SANDWICH" DE DOS ANTICUERPOS.

III. PARTE EXPERIMENTAL.

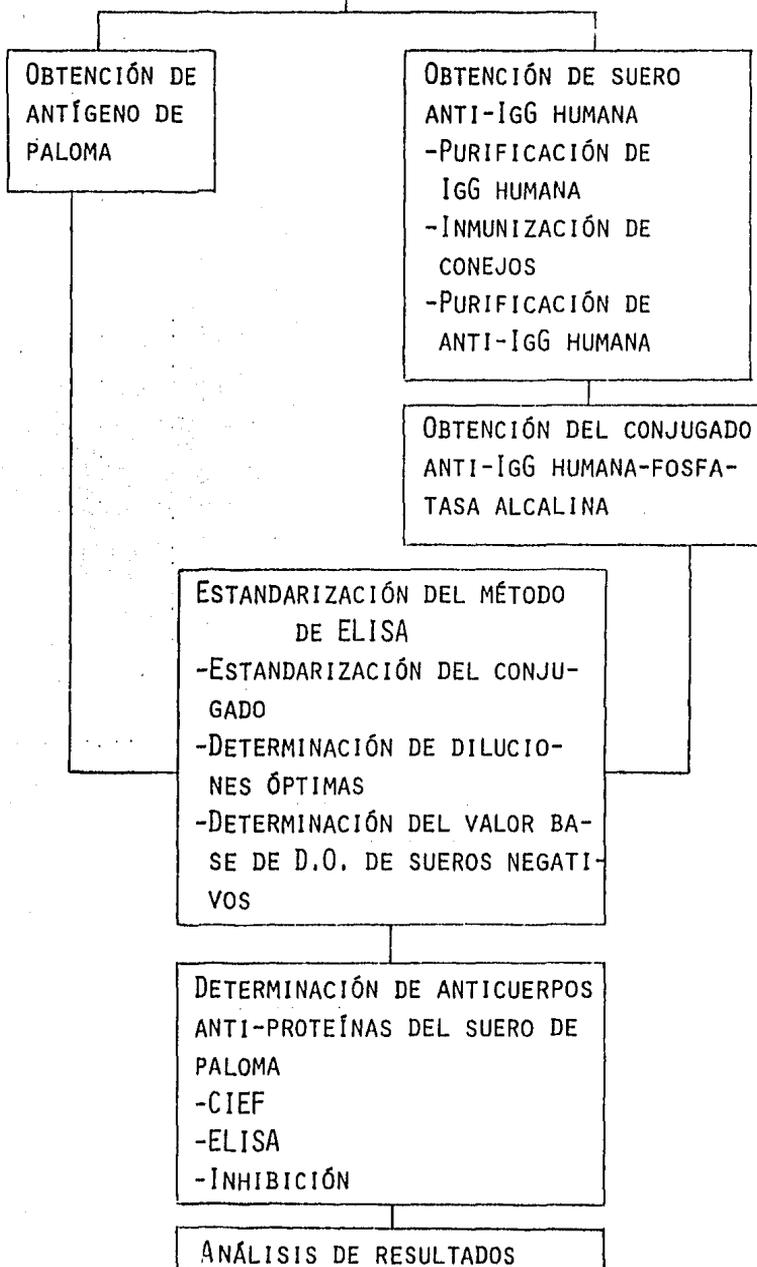
1. ESQUEMA GENERAL.

EL PASO MÁS IMPORTANTE EN LA PREPARACIÓN DEL MÉTODO INDIRECTO DE ELISA QUE VA A SER UTILIZADO PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS HUMANOS DE LA CLASE IGG CONTRA PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMAS ANTES DE SU ESTANDARIZACIÓN EN SÍ, ES EL DE PRODUCIR UN ANTICUERPO UNIDO COVALENTEMENTE A LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA, PARA QUE SEA CAPAZ DE RECONOCER LA IGG HUMANA Y QUE A SU VEZ NOS INDIQUE EN QUE CANTIDAD EXISTE ÉSTA POR MEDIO DE LA REACCIÓN DE HIDRÓLISIS DEL SUSTRATO, EL P-NITROFENOL FOSFATO CON LA ENZIMA.

LA PREPARACIÓN DE ESTE CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA REQUIERE DE ALGUNOS PASOS PREVIOS, COMO ES LA PURIFICACIÓN DE LA IGG HUMANA QUE SERÁ INOCULADA A CONEJOS PARA LA OBTENCIÓN DE UN SUERO QUE CONTENGA ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA, LA PURIFICACIÓN DE ÉSTOS Y FINALMENTE SU CONJUGACIÓN CON LA ENZIMA. UNA VEZ PRODUCIDO EL CONJUGADO, SE REQUIERE DE SU ESTANDARIZACIÓN PARA CONOCER LA DILUCIÓN QUE SERÁ UTILIZADA EN LAS PRUEBAS.

LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA INCLUYE LA DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN DEL SUERO DE PALOMA QUE SERÁ USADA PARA SENSIBILIZAR LA PLACA Y LA DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN DE LOS SUEROS DE PACIENTES QUE SERÁN ESTUDIADOS. EL SIGUIENTE ESQUEMA MUESTRA EL DIAGRAMA DE TRABAJO DESARROLLADO EN NUESTRO ESTUDIO:

DESARROLLO DEL METODO DE ELISA



2. DESARROLLO DEL METODO ELISA.

2.1 ANTÍGENOS DE PALOMA.

DEBIDO A QUE EL SUERO DE PALOMA CONTIENE LOS ANTÍGENOS MÁS IMPORTANTES QUE CAUSAN LA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD A PROTEÍNAS DE PALOMA, ÉSTE FUÉ UTILIZADO COMO FUENTE DE ANTÍGENO PARA LA PRUEBA. EL SUERO DE PALOMA SE OBTUVÓ POR CENTRIFUGACIÓN DE SANGRE EXTRAÍDA POR PUNCIÓN CARDÍACA DE PALOMAS. TODO EL SUERO FUÉ GUARDADO A -40°C HASTA SER USADO.

2.2 OBTENCIÓN DEL SUERO ANTI-IGG HUMANA.

2.2.1 PURIFICACIÓN DE IGG HUMANA.

SE OBTUVÓ IGG HUMANA DE UNA MEZCLA DE SUEROS HUMANOS NORMALES (SHN) OBTENIDOS A PARTIR DE SANGRE DE DONADORES SANOS.

LAS INMUNOGLOBULINAS FUERON PRECIPITADAS CON SULFATO DE AMONIO SATURADO HASTA ALCANZAR UNA CONCENTRACIÓN DEL 50% DE SATURACIÓN A PARTIR DEL SUERO, SIGUIENDO LA TÉCNICA DE PRECIPITACIÓN CON SALES NEUTRAS (APÉNDICE I), CON ÉSTA CONCENTRACIÓN SE ASEGURA LA MÁXIMA PRECIPITACIÓN DE GAMMAGLOBULINA, AUNQUE SE ENCUENTRAN CONTAMINADAS CON OTRAS FRACCIONES, POR LO QUE ESTE PASO SOLO SE CONSIDERA UNA SEMIPURIFICACIÓN. EL PRECIPITADO OBTENIDO SE REDISUELVE Y CON EL FIN DE AUMENTAR LA PUREZA DE LA IGG, SE PASA A TRAVÉS DE UNA COLUMNA DE INTERCAMBIO IÓNICO DE DIETILAMINOETIL CELULOSA EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.01M A PH 8.0; CON ESTO SE ASEGURA LA RETENCIÓN DE TODAS LAS PROTEÍNAS CON CARGA NETA NEGATIVA DEJANDO PASAR ÚNICAMENTE GAMMAGLOBULINAS EN SU MAYORÍA IGG.

SE DETERMINÓ LA ABSORBANCIA A 280NM DE CADA UNA DE LAS FRACCIONES COLECTADAS Y SE JUNTARON LAS QUE DIERAN UNA LECTURA MAYOR A 0.200 DE D.O. LA IGG PURIFICADA FUÉ CONCENTRADA POR ULTRAFILTRACIÓN CON UN EQUIPO DE FILTRACIÓN MILLIPORE CX 10. LA CONCENTRACIÓN PROTEICA FUÉ CUANTIFICADA POR EL MÉTODO DE LOWRY (APÉNDICE I) Y AJUSTADA A 5MG/ML.

PARA DETERMINAR LA PUREZA DE LA IGG EN LA FRACCIÓN CONCENTRADA SE CORRIÓ UNA INMUNOELECTROFESIS (APÉNDICE II). EN ESTE ENSAYO SE CORRIERON TANTO UNA MUESTRA DE SHN, COMO UNA MUESTRA DE LA PROTEÍNA PURIFICADA CONTRA SUERO ANTI-HUMANO POLIVALENTE OBTENIDO EN CONEJO. LA PROTEÍNA PURIFICADA MOSTRÓ UNA BANDA AISLADA DE PRECIPITACIÓN CON MOVILIDAD GAMMA.

2.2.2 OBTENCIÓN DE SUERO ANTI-IGG HUMANA.

PARA OBTENER EL SUERO ANTI-IGG HUMANA SE INOCULARON DOS CONEJOS DE ACUERDO AL SIGUIENTE ESQUEMA DE INMUNIZACIÓN (28):

SEMANA	DIA	VIA DE INOCULACION Y DOSIS
1A.	1	GANGLIOS POPLÍTEOS Y SUBCUTÁNEA. 2MG.
3A.	21	INTRAMUSCULAR Y SUBCUTÁNEA 2MG.
6A.	42	SANGRÍA DE PRUEBA INTRAMUSCULAR 2MG.
8A.	63	SANGRADO A BLANCO

SE UTILIZARON CONEJOS DE LA RAZA NUEVA ZELANDA DE 2,5KG DE PESO Y ANTES DE PROCEDER A LA INMUNIZACIÓN SE REALIZÓ UN SANGRADO PREVIO CON EL FIN DE TENER UN SUERO CONTROL NEGATIVO. CADA CONEJO FUÉ INMUNIZADO POR VÍA SUBCUTÁNEA Y VÍA GANGLIOS POPLÍTEOS. SE INYECTARON 0.2ML DE UNA SOLUCIÓN AL 2.5% DE AZUL DE EVANS EN SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA ENTRE LOS COJINETES DE CADA UNA DE LAS PATAS TRASERAS DEL CONEJO UNA HORA ANTES DE LA CIRUGÍA. EL CONEJO SE ANESTESIÓ CON ÉTER, SE RASURÓ Y SE HICIERON INCISIONES EN LA PARTE POSTERIOR DE LOS MUSLOS; SE LOCALIZARON LOS GANGLIOS TEÑIDOS DE AZUL POR EL COLORANTE.

LAS PRIMERAS INMUNIZACIONES SE REALIZARON INYECTANDO A CADA ANIMAL 2MG DE IGG HUMANA EMULSIFICADOS CON 1ML DE ADYUVANTE COMPLETO DE FREUND EN DOS SITIOS LINFÁTICOS Y EN CUATRO SITIOS SUBCUTÁNEOS. A LAS 3 SEMANAS SE REPITIÓ LA INMUNIZACIÓN EN CUATRO SITIOS SUBCUTÁNEOS Y DOS SITIOS INTRAMUSCULARES. A LAS 3 SEMANAS SE REALIZÓ UNA SANGRIA DE PRUEBA POR PUNCIÓN EN LA VENA MARGINAL DE LA OREJA, APLICÁNDOSE UN REFUERZO POR VÍA INTRAMUSCULAR Y SE DETERMINÓ EL TÍTULO DE ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA POR INMUNODIFUSIÓN DOBLE (IDD) DE ACUERDO AL MÉTODO DE OUCHTERLONY (APÉNDICE II). SE PRUEBAN DILUCIONES SERIADAS DEL SUERO ANTI-IGG HUMANA (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32) FRENTE A SHN. DE ACUERDO AL RESULTADO DE LA SANGRIA DE PRUEBA, SI EL TÍTULO ES ADECUADO SE PROCEDE A SANGRAR AL ANIMAL PARA OBTENER EL MÁXIMO DE SUERO POSIBLE POR MEDIO DE UNA PUNCIÓN CARDÍACA.

2.2.3 PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA.

EL SUERO DE CONEJO SE FRACCIONA CON SULFATO DE AMONIO SATURADO PARA SEPARAR LAS INMUNOGLOBULINAS QUE CONTIENEN LA ANTI-IGG HUMANA (APÉNDICE I). POSTERIORMENTE LOS ANTICUERPOS ESPECÍFICOS SE PURIFICAN A PARTIR DE ESTA FRACCIÓN POR

ADSORCIÓN A UNA FASE INSOLUBLE DE GAMMAGLOBULINA HUMANA SIGUIENDO LA TÉCNICA DE ÁVRAMEAS Y TERNYNCK QUE CONSISTE EN ADSORBER ESTOS ANTICUERPOS A UNA MATRIZ INSOLUBLE DE GAMMAGLOBULINA HUMANA Y ELUIRLOS CON UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE GLICINA-HCL A PH 2,8 (APÉNDICE II). LA CONCENTRACIÓN PROTEICA DE LA FRACCIÓN PURIFICADA QUE ÚNICAMENTE CONTIENE ANTICUERPO ANTI-IGG HUMANA FUÉ DETERMINADA POR EL MÉTODO DE LOWRY Y AJUSTADA A 2MG/ML.

2.3 OBTENCIÓN DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA.

LA CONJUGACIÓN DE LA ANTI-IGG HUMANA CON LA FOSFATASA ALCALINA SE LOGRA CON EL MÉTODO DE DOS PASOS DE ÁVRAMEAS Y TERNYNCK (4) SIGUIENDO LA SIGUIENTE TÉCNICA:

1. SE CENTRIFUGA LA FOSFATASA ALCALINA DE FUENTE COMERCIAL (0.16ML, 5.4MG/ML) QUE SE ENCUENTRA PRECIPITADA EN SULFATO DE AMONIO SATURADO. SE DESECHA EL SOBRENADANTE.
2. SE DISUELVE LA FOSFATASA ALCALINA EN 0.5ML DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.1M PH 6.8 . SE DIALIZA DURANTE LA NOCHE CONTRA LA MISMA SOLUCIÓN.
3. SE AÑADE 0.1ML DE GLUTARALDEHIDO 1.2%. SE AGITA SUAVEMENTE DURANTE UNA HORA A TEMPERATURA AMBIENTE.
4. SE DIALIZA CONTRA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.1M PH 6,8 DURANTE DOS HORAS.
5. SE AÑADE 0.4ML DE ANTI-IGG HUMANA CON UNA CONCENTRACIÓN DE 4MG/ML, SE AGITA POR DOS HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE.
6. SE DIALIZA CONTRA UNA SOLUCIÓN DE TRIS 0.05M PH 8.0 DURANTE LA NOCHE.
7. SE LLEVA A 4ML CON LA SOLUCIÓN DE TRIS 0.05M PH 8.0 EL CUAL CONTIENE 1% DE ALBÚMINA SÉRICA BOVINA Y 0.02% DE AZIDA DE SODIO. SE GUARDA EN LA OSCURIDAD A 4°C.

2.4 ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ELISA.

2.4.1 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA.

PARA DETERMINAR ESTA DILUCIÓN SE REQUIERE DE UNA PLACA SENSIBILIZADA CON IGG HUMANA, PARA ELLO SE PREPARA UNA SOLUCIÓN DE IGG HUMANA DE 100NG/ML EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CARBONATO DE SODIO-BICARBONATO DE SODIO 0.05M, PH 9.6 Y SE PONEN 200 MICROLITROS DE ESTA SOLUCIÓN A CADA POZO DE LA PLACA. LAS PLACAS UTILIZADAS SON DE POLIESTIRENO CON POZOS DE FONDO PLANO. ESTAS FAVORECEN QUE LAS PROTEÍNAS SE ADHIERAN A LA PARED DE LOS POZOS, LO QUE SE FAVORECE AÚN MÁS AL USAR UNA SOLUCIÓN ALCALINA COMO LA DE CARBONATOS. LA PLACA SE INCUBA DURANTE 18 HORAS A 4°C EN CÁMARA HÚMEDA. AL TÉRMINO DE LA INCUBACIÓN, LA PLACA SE LAVAR 3 VECES CON SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATOS (SSAF) 0.01M PH 7.4 CONTENIENDO 0.05% DE TWEEN 20 Y 0.02% DE AZIDA DE SODIO, DEJANDO ESTA SOLUCIÓN DE 3-5 MINUTOS ANTES DE ENJUAGARSE EN CADA OCASIÓN. EL LAVADO SE DEBE HACER PARA ASEGURAR QUE NO SE QUEDEN RESIDUOS DE IGG EN SOLUCIÓN QUE NO SE HAYAN PEGADO A LA PARED DE LOS POZOS. DESPUÉS DE LAVAR LA PLACA ES NECESARIO ASEGURAR QUE LOS POZOS QUEDEN TOTALMENTE RECUBIERTOS PARA EVITAR QUE MÁS ADELANTE SE ADHIERA INESPECÍFICAMENTE EL CONJUGADO, LO QUE PRODUCIRÍA UNA REACCIÓN FALSA POSITIVA. PARA LOGRAR ESTE BLOQUEO SE DEBE UTILIZAR UNA SOLUCIÓN PROTEICA QUE NO REACCIONE CON LA ANTI-IGG HUMANA DEL CONJUGADO. EN ESTE ESTUDIO FUÉ UTILIZADA UNA SOLUCIÓN DE ALBÚMINA SÉRICA HUMANA (ASH) QUE CONTENÍA 0.04MG/ML. SE AÑADEN 200 MICROLITROS A TODOS LOS POZOS Y SE INCUBA UNA HORA A 37°C EN CÁMARA HÚMEDA. LA CONCENTRACIÓN Y EL TIEMPO DE INCUBACIÓN FUERON FIJADOS ARBITRARIAMENTE CONSIDERÁNDOLOS SUFI-

CIENTES PARA EL BLOQUEO DE LOS POZOS. SE REPITE LA OPERACIÓN DE LAVADO Y SE AÑADEN 200 MICROLITROS POR DUPLICADO DE DILUCIONES DEL CONJUGADO ANTI-IGG-FOSFATASA ALCALINA, CON EL FIN DE DETERMINAR LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE ÉSTE, SIN QUE PIERDA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA E INMUNOLÓGICA PARA SER UTILIZADA EN LAS PRUEBAS. LAS DILUCIONES PROBADAS FUERON: 1:50, 1:100, 1:200, 1:400, 1:800 Y 1:1000, USÁNDOSE COMO DILUYENTES LA MISMA SOLUCIÓN DE SSAF TWEEN. LA PLACA SE INCUBA UNA HORA A 37°C EN CÁMARA HÚMEDA. SE LAVA PARA ELIMINAR EL EXCESO DE CONJUGADO QUE NO SE PEGÓ Y SE AÑADEN 200 MICROLITROS DEL SUSTRATO DE LA FOSFATASA ALCALINA. EN ESTE CASO FUÉ UTILIZADO EL P-NITROFENIL FOSFATO DE FUENTE COMERCIAL A UNA CONCENTRACIÓN DE 1MG/ML EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE DIETANOLAMINA PH 9.8. SE INCUBA A TEMPERATURA AMBIENTE EN CÁMARA HÚMEDA. LA REACCIÓN ENZIMÁTICA SE PARA CON 100 MICROLITROS DE NAOH 3M, 30 MINUTOS DESPUÉS Y SE LEE LA ABSORBANCIA A 405NM EN UN ESPECTROFOTÓMETRO USANDO COMO BLANCO EL SUSTRATO SIN REACCIONAR. EN ESTE CASO SE UTILIZÓ UN ESPECTROFOTÓMETRO CON MICROCELDA DE FLUJO, LO QUE PERMITE HACER LECTURAS CON APROXIMADAMENTE 500 MICROLITROS DE MUESTRA. ES IMPORTANTE QUE EN TODOS LOS CONJUGADOS QUE SE PREPAREN Y EN LAS PRUEBAS QUE SE REALICEN MÁS ADELANTE, SE MANTENGAN LAS CONDICIONES SIEMPRE IDÉNTICAS INCLUSO EN EL USO DEL MISMO ESPECTROFOTÓMETRO.

CONTROLES:

1. SE USAN 2 POZOS QUE SE SENSIBILIZAN CON IGG Y NO SE BLOQUEAN CON ASH EN EL SEGUNDO PASO DEL ENSAYO.
2. DOS POZOS SENSIBILIZADOS CON IGG HUMANA A LOS CUALES NO SE LES ADICIONA CONJUGADO SINO ÚNICAMENTE SSAF.
3. DOS POZOS QUE SE SENSIBILIZAN CON ALBÚMINA SÉRICA BOVINA 100NG/ML EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CARBONATOS.
4. DOS POZOS QUE NO SE SENSIBILIZAN SINO QUE ÚNICAMENTE SE

AÑADE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CARBONATOS.

LA DILUCIÓN DEL CONJUGADO QUE DÉ UNA LECTURA DE 1.000 DE DENSIDAD ÓPTICA, SE CONSIDERA LA ÓPTIMA Y SE USA COMO DILUCIÓN DE TRABAJO ESTÁNDAR PARA PRUEBAS FUTURAS (60,17).

2.4.2 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE ANTÍGENO (SUERO DE PALOMA) Y DE SUEROS CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS.

LA PLACA SE SENSIBILIZA CON DILUCIONES DEL SUERO DE PALOMA EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE CARBONATOS 0.05M PH 9.6. LAS DILUCIONES PROBADAS FUERON: 1:50, 1:100, 1:200 Y 1:400 Y SE AÑADEN 200 MICROLITROS DE CADA DILUCIÓN A CADA 2 POZOS (POR DUPLICADO) SE INCUBA 18 HORAS A 4°C EN CÁMARA HÚMEDA (59). DE AQUÍ SE ESCOGERÁ LA DILUCIÓN A USAR PARA RECUBRIR LA PLACA EN TODAS LAS DETERMINACIONES QUE SE REALICEN. SE LAVA, SE BLOQUEA CON ASH, SE LAVA NUEVAMENTE Y SE ADICIONAN 200 MICROLITROS DEL CONTROL POSITIVO (SUERO DE PACIENTES CON ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA DEMOSTRADOS POR EL MÉTODO DE CIEF) Y DEL CONTROL NEGATIVO (SUERO DE DONADORES SANOS PROBADOS EN CIEF) DILUIDOS 1:10, 1:20, 1:40, 1:100, 1:200 Y 1:400, DE AQUÍ SE ESCOGERÁ LA DILUCIÓN PARA TRABAJAR SIEMPRE EL SUERO DEL PACIENTE, ADEMÁS SE CORRE UNA FILA DE POZOS QUE SE SENSIBILIZAN CON SSAF TWEEN ÚNICAMENTE. SE INCUBA LA PLACA 30 MINUTOS A 37°C EN CÁMARA HÚMEDA. SE LAVAN LOS POZOS Y EN EL SIGUIENTE PASO SE AÑADEN 200 MICROLITROS DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DEL CONJUGADO Y SE INCUBA UNA HORA A 37°C EN CÁMARA HÚMEDA. SE LAVA DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN Y SE ADICIONAN 200 MICROLITROS DE SUSTRATO P-NITROFENIL FOSFATO EN SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE DIETANOLAMINA PH 9.8. SE INCUBA A TEMPERATURA AMBIENTE EN CÁMARA HÚMEDA DURANTE 5 MINUTOS PARA EL DESARROLLO DE COLOR

AMARILLO EN LOS POZOS; ESTE TIEMPO SERÁ SIEMPRE EL MISMO AL CORRER LOS PROBLEMAS. DESPUÉS DE LA INCUBACIÓN LA REACCIÓN ENZIMÁTICA SE DETIENE CON 100 MICROLITROS DE $\text{NaOH } 3\text{M}$ Y SE LEE LA ABSORBANCIA A 405NM.

2.4.3 DETERMINACIÓN DEL VALOR BASE DE DENSIDAD ÓPTICA (D.O.) PARA SUEROS NEGATIVOS.

UNA VEZ DETERMINADA LA DILUCIÓN DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA QUE SE USARÁ, LA DILUCIÓN DEL SUERO DE PALOMA PARA SENSIBILIZAR LA PLACA Y LA DILUCIÓN DE LOS SUEROS DE PACIENTES QUE SE ANALIZARÁN, ES NECESARIO DETERMINAR UN VALOR BASE DE D.O. PARA SUEROS NEGATIVOS ARRIBA DEL CUAL, CUALQUIER VALOR REPRESENTARÁ PRESENCIA DE ANTICUERPOS CONTRA PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA, ES DECIR, UN RESULTADO POSITIVO. PARA ELLO SE REALIZÓ EL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO CON 48 SUEROS DE INDIVIDUOS APARENTEMENTE SANOS. EL VALOR BASE SE DETERMINÓ CALCULANDO LA MEDIA ARITMÉTICA (\bar{X}) DE LA D.O. DE LOS 48 SUEROS SUMADA A DOS VECES EL VALOR DE SU DESVIACIÓN ESTÁNDAR.

3. DETERMINACION DE ANTICUERPOS DE CLASE IgG EN MUESTRAS DE PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA.

3.1 MÉTODO DE ELISA.

EL MÉTODO INMUNOENZIMÁTICO DE ELISA FUÉ UTILIZADO EN LOS SIGUIENTES GRUPOS DE PACIENTES:

GRUPO I. TRECE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMAS. EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO SE BASO EN LAS SIGUIENTES EVIDENCIAS:

- ANTECEDENTES DE CONTACTO CON PALOMAS, YA SEA DIRECTO POR CONVIVENCIA CON LOS ANIMALES Y ASEO DE SU VIVIENDA O INDIRECTO, CUANDO LOS ANIMALES EXISTÍAN EN CERCANIA DE LA HABITACIÓN DEL ENFERMO.
 - DEFECTO FUNCIONAL PULMONAR PREDOMINANTE O EXCLUSIVAMENTE RESTRICTIVO.
 - ESTERTORES SUBCREPITANTES CRUJIENTES.
 - RADIOGRAFÍA DE TÓRAX CON SIGNOS DE ENFERMEDAD INTERSTICIAL.
 - BIOPSIA PULMONAR CON NEUMONITIS INTERSTICIAL DIFUSA Y/O GRANULOMAS.
 - MEJORÍA CLÍNICA Y FUNCIONAL AL SUSPENDERSE LA EXPOSICIÓN AÚN EN AUSENCIA DE TRATAMIENTO.
 - COMO CRITERIO DE EXCLUSIÓN: AUSENCIA DE OTRA ENFERMEDAD CAPAZ DE EXPLICAR EL CUADRO.
- GRUPO II. NUEVE PACIENTES CON OTRO TIPO DE NEUMOPATÍAS.

3.2 ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL MÉTODO ELISA.

ESTE ENSAYO SE REALIZÓ CON EL FIN DE ESTABLECER LA ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO. EL ESTUDIO POR INHIBICIÓN FUÉ EL SIGUIENTE:

PREVIAMENTE A LA DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS POR EL MÉTODO DE ELISA, SE INTENTÓ NEUTRALIZAR UN SUERO CONTROL POSITIVO (SUERO CON ANTICUERPOS DE CLASE IGG ANTI-PROTEÍNAS DE PALOMA) CON (A) SUERO DE CONEJO ANTI-IGG HUMANA Y (B) CON ANTÍGENO DE PALOMA.

MUESTRA (0.1ML)	INHIBIDOR (0.1ML)
CONTROL +	ANTI- IGG
CONTROL +	ANTI- IGG 1:5
CONTROL +	ANTI- IGG 1:10
CONTROL +	AG PALOMA
CONTROL + 1:2	AG PALOMA
CONTROL + 1:4	AG PALOMA

SE INCUBA 30 MINUTOS A 37°C, SE CENTRIFUGA, SE TOMA SOBRENADANTE Y SE REALIZA ELISA.

3.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA POR CIEF.

SE REALIZÓ EL ANÁLISIS DE CIEF DE SUEROS DE PACIENTES QUE RESULTARON POSITIVOS EN EL ENSAYO INMUNOENZIMÁTICO, CON SUERO SIN DILUIR Y DILUCIONES 1:5, 1:10 Y 1:50, CONTRA EL SUERO DE PALOMA. LA TÉCNICA DE CIEF SE DETALLA EN EL APÉNDICE II.

4. ESTUDIOS REALIZADOS EN LIQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA.

LOS ESTUDIOS SE REALIZARON CON 19 PACIENTES CON ENFER-

MEDAD PULMONAR QUE ESTABAN SIENDO ESTUDIADOS COMO PROTOCOLO DE NEUMONITIS INTERSTICIAL Y PARA LO CUAL SE REALIZÓ UN LAVADO BRONCOALVEOLAR.

EN TODOS LOS PACIENTES SE REALIZÓ LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DE PALOMA EN SUERO Y EN LBA POR LOS MÉTODOS DE ELISA Y CIEF. (TODOS LOS LÍQUIDOS DE LAVADO BRONCOALVEOLAR ESTUDIADOS POR EL MÉTODO DE ELISA FUERON DILUIDOS 1:10). ADEMÁS SE REALIZÓ UN ESTUDIO DE INHIBICIÓN DE ELISA EN LOS LÍQUIDOS Y SE DETERMINÓ EL PORCIENTO DE INHIBICIÓN.

IV. RESULTADOS Y DISCUSION.

1. PURIFICACION DE IGG HUMANA.

DE ACUERDO AL DIAGRAMA DE TRABAJO ESTABLECIDO, EL PRIMER PASO PARA LA PRODUCCIÓN DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA FUÉ LA PURIFICACIÓN DE IGG HUMANA PARA SU INOCULACIÓN EN CONEJOS Y ASÍ OBTENER UN SUERO MONOESPECÍFICO ANTI-IGG HUMANA.

LOS PASOS EN LA PURIFICACIÓN Y SUS RESULTADOS FUERON LOS SIGUIENTES:

1.1 PRECIPITACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS HUMANAS CON SULFATO DE AMONIO SATURADO (SAS).

SE REALIZÓ UNA PRECIPITACIÓN DE GLOBULINAS CON SAS CON EL FIN DE LOGRAR UNA SEMIPURIFICACIÓN DE IGG. PARA DEMOSTRAR QUE LA IGG QUEDÓ EN LA FRACCIÓN PRECIPITADA, SE REALIZÓ UNA ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS EN ACETATO DE CELULOSA DE ÉSTA FRACCIÓN REDISUELTA Y SE COMPARÓ CON LA DE LA FRACCIÓN DE PROTEÍNAS QUE QUEDARON EN SOLUCIÓN. LOS PATRONES ELECTROFORETICOS LEÍDOS EN DENSITÓMETRO MUESTRAN QUE LAS PROTEÍNAS PRECIPITADAS SON PRINCIPALMENTE BETA Y GAMMA GLOBULINAS MIENTRAS QUE EL SOBRENADANTE TIENE UNA ALTA CONCENTRACIÓN DE ALBÚMINA:

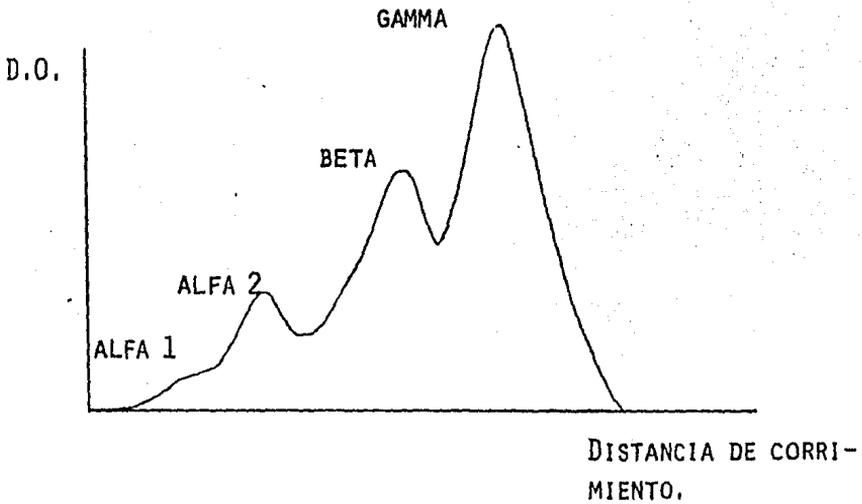


FIG. 6 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DE LA FRACCIÓN PRECIPITADA CON SAS.

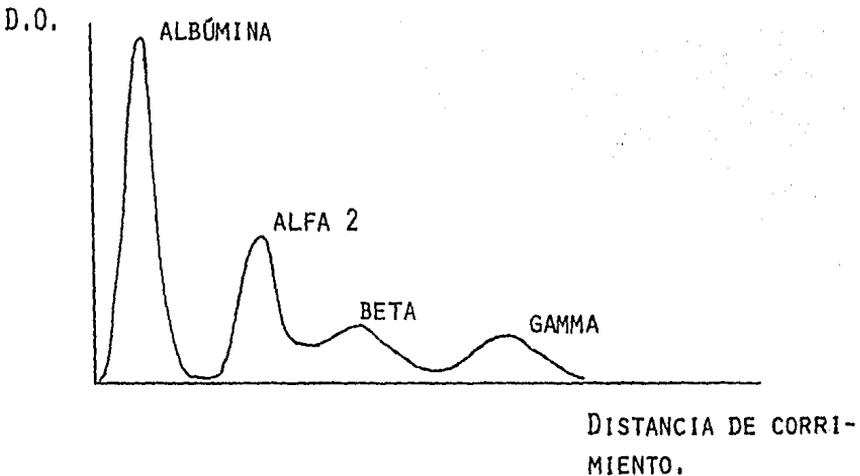


FIG. 7 ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS DEL SOBRENADANTE DESPUÉS DE LA ADICIÓN DE SAS.

1.2 CROMATOGRAFÍA DE INTERCAMBIO IÓNICO.

LA PUREZA DE LA IGG SE AUMENTÓ HACIENDO PASAR EL PRECIPITADO REDISUELTO A TRAVÉS DE UNA COLUMNA DE DEAE CELULOSA. LA FRACCIÓN PROTEICA QUE FUÉ ELUÍDA DE LA COLUMNA MOSTRÓ EN ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA UN SOLO PICO DE PROTEÍNAS CORRESPONDIENTE A GAMMAGLOBULINAS EN SU MAYORÍA A IGG. EL RESTO DE LAS PROTEÍNAS FUERON RETENIDAS EN LA COLUMNA, (FIG. 8).

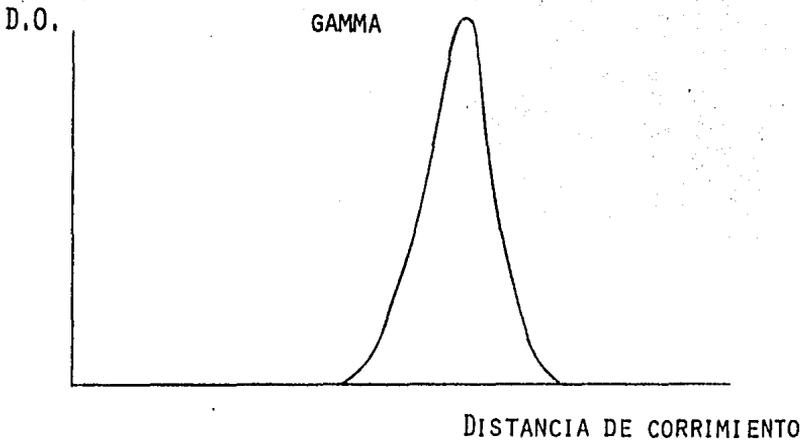


FIG. 8 ELECTROFORESIS DE LA PRIMERA FRACCIÓN DE PROTEÍNAS ELUÍDA DE LA COLUMNA DE DEAE-CELULOSA.

1.3 INMUNOELECTROFORESIS DE LA FRACCIÓN PROTEICA NO RETENIDA POR DEAE CELULOSA.

ESTA IEF FUÉ REALIZADA CON EL FIN DE CONOCER LA COMPOSICIÓN DE LA PROTEÍNA ELUÍDA DE LA COLUMNA DE DEAE CELULOSA Y DE DETERMINAR SU PUREZA. LA PRUEBA MOSTRÓ UNA SOLA BANDA DE PRECIPITACIÓN HETEROGÉNEA CON MOVILIDAD GAMMA. ESTA BANDA FUÉ COMPARADA CON UN PATRÓN EN LA LITERATURA (55), CON LO QUE SE DEMOSTRÓ QUE CORRESPONDÍA A IGG. (FIG. 9).

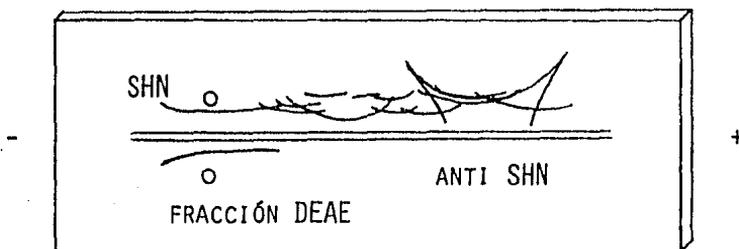


FIG. 9 IEF DE LA FRACCIÓN OBTENIDA DE LA COLUMNA DE DEAE CELULOSA.

2. OBTENCION Y PURIFICACION DE ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA.

2.1 OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA.

LA IGG HUMANA PURIFICADA FUÉ UTILIZADA PARA INOCULAR CONEJOS QUE PRODUCERON UN ANTICUERPO QUE REACCIONÓ EN IEF ÚNICAMENTE CON UNA PROTEÍNA DE LA FRACCIÓN GAMMAGLOBULINA DEL SUERO HUMANO NORMAL E HIZO IDENTIDAD INMUNOLÓGICA CON UN SUERO ANTI-IGG HUMANA DE FUENTE COMERCIAL, (FIG. 10).

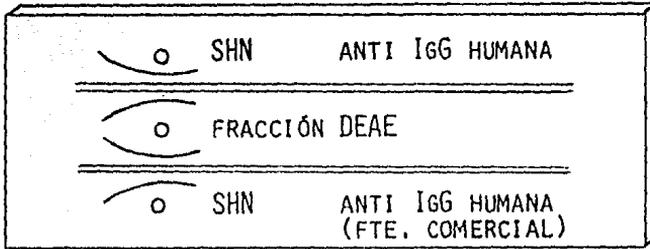


FIG. 10 IEF DEL ANTICUERPO ANTI-IGG HUMANA PRODUCIDO EN CONEJO.

EL TÍTULO OBTENIDO EN LA SANGRÍA DE PRUEBA AL HACER DILUCIONES SERIADAS DEL SUERO INMUNE EN IDD FUÉ DE 1:8, EL SUERO FUE PURIFICADO POR LA TÉCNICA DE ÁVRAMEAS Y TERNINCK PARA OBTENER EL ANTICUERPO ANTI-IGG HUMANA MONOESPECÍFICO.

3. ESTANDARIZACION DEL METODO DE ELISA.

ESTA ESTANDARIZACION SE REALIZÓ DESPUÉS DE CONJUGAR EL ANTICUERPO ANTI-IGG HUMANA CON LA FOSFATASA ALCALINA POR LOS MÉTODOS YA DESCRITOS.

3.1 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA.

ESTA DETERMINACIÓN SE REALIZÓ CON EL FIN DE CONOCER LA MÁXIMA DILUCIÓN DEL CONJUGADO PREPARADO QUE MANTENGA SU ACTIVIDAD TANTO ENZIMÁTICA COMO INMUNOLÓGICA Y SE CONSIDE-

RA ÓPTIMA CUANDO SE PRODUCE UNA COLORACIÓN AMARILLA EN LA REACCIÓN CON EL P-NITROFENIL FOSFATO QUE AL SER LEÍDA EN UN ESPECTROFOTÓMETRO A 405NM DÉ UNA LECTURA DE DENSIDAD ÓPTICA DE 1,000.

LAS DILUCIONES PROBADAS Y LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE ENCUENTRAN EN LA SIGUIENTE TABLA:

TABLA #2

DILUCIÓN DEL CONJUGADO	D.O. 405NM
1:50	*
1:100	*
1:200	*
1:400	1,894
1:800	0,810
1:1000	0,312

LECTURA REALIZADA 30 MIN. DESPUÉS DE LA ADICIÓN DEL SUSTRATO A TEMPERATURA AMBIENTE.

BLANCO: SOLUCIÓN DE SUSTRATO SIN REACCIONAR.

* LECTURA EXCEDIDA.

DILUCIONES DEL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA PROBADAS PARA LA DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA.

DE ACUERDO A ESTOS RESULTADOS, SE ESCOGIÓ COMO ÓPTIMO DILUIR EL CONJUGADO 1:600 CONSIDERANDO QUE LA DILUCIÓN 1:400 DA UNA LECTURA MUY ALTA Y LA 1:800 SE ENCUENTRA POR DEBAJO DE 1,000 DE D.O.

LOS VALORES DE D.O. OBTENIDOS EN LOS CONTROLES UTILIZANDO EL CONJUGADO DILUIDO 1:600 SE MUESTRAN EN LA SIGUIENTE TABLA:

TABLA # 3

SENSIBILIZACIÓN	BLOQUEO ASH	CONJUGADO	D.O. 405NM
IgG	SI	SI	1.036
IgG	NO	SI	1.279
IgG	SI	NO	0.161
ASB	SI	SI	0.120
SOL. AMORT.	SI	SI	0.374

D.O. DE LOS CONTROLES AL ESTANDARIZAR EL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA.

LA LECTURA DE D.O. AL REALIZAR EL ENSAYO SIN BLOQUEO ES MAYOR A LA QUE SE OBTIENE ADICIONANDO ASH CUANDO LOS POZOS FUERON SENSIBILIZADOS CON IgG Y CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA, LO QUE INDICA QUE EL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA SE PEGA INESPECÍFICAMENTE A LAS PAREDES DE LOS POZOS Y QUE AL RECUBRIRLAS CON UNA PROTEÍNA BLOQUEADORA SE ELIMINA ESTE PROBLEMA. LOS RESULTADOS MUESTRAN LA NECESIDAD DE REALIZAR EL BLOQUEO EN EL SISTEMA.

3.2 DETERMINACIÓN DE LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE ANTÍGENO (SUERO DE PALOMA) Y DE SUEROS CONTROLES POSITIVOS Y NEGATIVOS.

LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE SUERO DE PALOMA ES AQUELLA QUE RECUBRE LA PLACA CON EL ANTÍGENO A UNA CONCENTRACIÓN QUE PUEDA SER RECONOCIDA POR EL ANTICUERPO. LA DILUCIÓN ÓPTIMA DE LOS SUEROS CONTROLES DEBE SER AQUELLA EN LA QUE

LA DIFERENCIA DE D.O. ENTRE EL SUERO POSITIVO Y EL NEGATIVO SEA MÁXIMA CON EL FIN DE LOGRAR DISCRIMINAR CLARAMENTE ENTRE ÉSTOS Y ASÍ EVITAR TOMAR ALGUNA MUESTRA NEGATIVA COMO POSITIVA O VICEVERSA.

LA DETERMINACIÓN SE REALIZÓ HACIENDO DILUCIONES TANTO DEL SUERO DE PALOMA PARA SENSIBILIZAR LA PLACA COMO DE LOS SUEROS CONTROLES SIMULTANEAMENTE.

LAS DILUCIONES PROBADAS DEL SUERO DE PALOMA FUERON 1:50, 1:100, 1:200, Y 1:400 MIENTRAS QUE LAS DEL SUERO CONTROL FUERON 1:10, 1:20, 1:40, 1:100, 1:200 Y 1:400.

DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS, LA DILUCIÓN ESCOGIDA COMO ÓPTIMA DEL SUERO DE PALOMA PARA SENSIBILIZAR LA PLACA FUÉ DE 1:400 Y LA DEL SUERO CONTROL (Y POR ELLO LA DE LOS SUEROS PROBLEMA) FUÉ DE 1:200. ESTAS DILUCIONES FUERON UTILIZADAS PARA TODAS LAS SIGUIENTES PRUEBAS.

3.3 DETERMINACIÓN DEL VALOR BASE DE D.O. PARA SUEROS NEGATIVOS.

SE PROBARON 48 MUESTRAS DE INDIVIDUOS APARENTEMENTE SANOS Y SE ESTABLECIÓ EL VALOR MÁXIMO NEGATIVO CON LOS RESULTADOS OBTENIDOS:

$$n = 48$$

$$\text{LECTURA MÁXIMA} = 0.596$$

$$\text{LECTURA MÍNIMA} = 0.066$$

$$\bar{X} = 0.223$$

$$\text{D.S.} = 0.136$$

$$\bar{X} + 2 \text{ D.S.} = 0.495$$

EN BASE A ESTO CUALQUIER MUESTRA QUE DÉ UNA LECTURA SUPERIOR A 0.495 SERÁ CONSIDERADA POSITIVA (PRESENCIA DE AN-

TICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA), MIENTRAS QUE CUALQUIER MUESTRA QUE DÉ UNA LECTURA MENOR A 0.495 SERÁ CONSIDERADA NEGATIVA.

4. DETERMINACION DE ANTICUERPOS ANTI-PALOMA DE CLASE IgG EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA.

4.1 MÉTODO DE ELISA.

EL MÉTODO DE ELISA ESTANDARIZADO PARA ESTA PRUEBA SE RESUME EN LOS SIGUIENTES PASOS:

- A) SENSIBILIZACIÓN DE LA PLACA CON SUERO DE PALOMA 1:400.
- B) BLOQUEO CON ASH 0.04mg/ML.
- C) ADICIÓN DE SUEROS PROBLEMA 1:200.
- D) ADICIÓN DE CONJUGADO ANTI-IgG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA 1:600.
- E) ADICIÓN DEL SUSTRATO P-NITROFENIL FOSFATO 1mg/ML EN MEDIO ALCALINO DURANTE 5 MINUTOS.
- F) INHIBICIÓN DE LA REACCIÓN ENZIMÁTICA CON NaOH 3M.
- G) LECTURA EN ESPECTROFOTÓMETRO A 405NM.

CON EL MÉTODO ESTANDARIZADO SE REALIZÓ EL ESTUDIO EN 2 GRUPOS DE PACIENTES, QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA # 4.

TABLA # 4

D.O. 405NM

1	1.214
2	1.013
3	0.672
4	1.120
5	0.621
6	0.679
7	0.997
8	0.602
9	1.460
10	1.331
11	1.295
12	0.691
13	1.343

GRUPO I

PACIENTES CON NEUMONITIS
INTERSTICIAL POR HIPERSEN-
SIBILIDAD A PALOMA

4.2 ENSAYO DE INHIBICIÓN DEL MÉTODO ELISA.

LOS RESULTADOS DE LA INHIBICIÓN DE ELISA CON SUERO DE
CONEJO ANTI-IGG HUMANA Y CON ANTÍGENO DE PALOMA SE MUESTRAN
EN LA SIGUIENTE TABLA:

D.O. 405NM

1	0.236
2	0.233
3	0.112
4	0.128
5	0.106
6	0.224
7	0.104
8	0.470
9	0.164

GRUPO II

PACIENTES CON OTRO TI-
PO DE NEUMOPATÍAS

TABLA # 5

MUESTRA	INHIBIDOR	ELISA D.O. 405NM
CONTROL +	ANTI-IGG	0.817
CONTROL +	ANTI-IGG 1:5	1.178
CONTROL +	ANTI-IGG 1:10	1.325
CONTROL +	AG PALOMA	0.327
CONTROL 1:2	AG PALOMA	0.262
CONTROL 1:4	AG PALOMA	0.218
CONTROL +		1.353

INHIBICIÓN DE ELISA CON ANTI-IGG Y ANTÍGENO DE PALOMA.

CON ESTOS RESULTADOS SE DEMUESTRA QUE EL ANTÍGENO DE PALOMA ES CAPAZ DE INHIBIR TOTALMENTE LOS ANTICUERPOS DEL SUERO POSITIVO EN LA REACCIÓN PREVIA A LA PRUEBA INMUNOENZIMÁTICA MIENTRAS QUE EL SUERO DE CONEJO ANTI-IGG HUMANA PARECE NO TENER LA CONCENTRACIÓN NECESARIA PARA BLOQUEAR TODOS LOS ANTICUERPOS DEL SUERO POSITIVO POR LO QUE LA INHIBICIÓN LOGRADA ES MUY BAJA.

4.3 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL CON HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA POR CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF).

SE CORRIERON 9 SUEROS POSITIVOS ANTI-PALOMA SIN DILUIR Y EN DILUCIONES 1:5, 1:10 Y 1:50 QUE FUERON PROBADOS PREVIAMENTE EN ELISA. TRES DE ELLOS FORMARON BANDA DE PRECIPITACIÓN HASTA LA DILUCIÓN 1:10. EL RESTO ÚNICAMENTE DIÓ BANDA DE PRECIPITACIÓN CON SUEROS SIN DILUIR.

5. ESTUDIOS REALIZADOS EN LIQUIDO DE LAVADO BRONCOAL-VEOLAR EN PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA.

LOS RESULTADOS SE EXPONEN EN FORMA COMPARATIVA EN LA TABLA # 6.

LOS RESULTADOS MUESTRAN LA GRAN VENTAJA QUE REPRESENTA EL MÉTODO DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS A MUY BAJAS CONCENTRACIONES COMO LO ES EN LBA EN COMPARACIÓN CON UNA TÉCNICA RUTINARIA (CIEF).

TABLA # 6

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PALOMA

No.	DIAGNÓSTICO AAE/OTRA	SUERO		LAVADO BRONCOALVEOLAR			
		CIEF	ELISA *	CIEF	ELISA *	ENSAYO DE INHIBICIÓN	% DE INHIB.
1	OTRA	+	0.170	NEG	0.736	0.069	91
2	AAE	+	1.606	+	1.788	0.136	92
3	OTRA	+	1.907	+	1.950	0.139	93
4	AAE	+	1.809	NEG	1.900	0.127	93
5	AAE	+	1.114	NEG	1.550	0.107	93
6	OTRA	NEG	0.060	NEG	0.186		
7	AAE	+	1.345	NEG	1.635	0.519	68
8	OTRA	NEG	0.154	NEG	0.136	0.144	0
9	OTRA	+	1.612	NEG	1.448	0.176	88
10	OTRA	NEG	0.071	NEG	0.154		
11	OTRA	NEG	0.341	NEG	0.493		
12	OTRA	NEG	0.250	NEG	0.134		
13	OTRA	NEG	0.050	NEG	0.094		
14	OTRA	NEG	0.015	NEG	0.581		
15	AAE	+	0.995	+	1.064		
16	AAE	NEG	0.769	NEG	0.828		
17	OTRA	NEG	0.050	NEG	0.035		
18	OTRA	NEG	0.040	NEG	0.085		
19	AAE	+	0.950	+	0.830		

*D.O. 405NM. VALORES NEGATIVOS <0.495

COMPARACIÓN DE RESULTADOS DE CIEF Y ELISA EN SUERO Y LBA DE PACIENTES CON ALVEOLITIS ALÉRGICA EXTRÍNSECA DEBIDA A ANTÍGENOS DE PALOMA (AAE) Y OTRAS NEUMOPATÍAS.

DISCUSION.

LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS CIRCULANTES CONTRA ALERGENOS AMBIENTALES SE HA REALIZADO DESDE QUE SE REPORTÓ LA NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD. LOS PRIMEROS MÉTODOS EMPLEADOS EN SU ESTUDIO FUERON TÉCNICAS SIMPLES DE BAJA SENSIBILIDAD COMO LA INMUNODIFUSIÓN DOBLE Y LA INMUNOELECTROFORESIS QUE PERMITIERON CONOCER ALGUNAS CARACTERÍSTICAS DE LOS ANTÍGENOS CAUSANTES DEL PADECIMIENTO. LA DEMOSTRACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DE PALOMA EN PACIENTES, HA SIDO LA PRUEBA CONFIRMATIVA EN EL LABORATORIO PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA, POR ELLO HA SIDO IMPORTANTE DESARROLLAR PRUEBAS MÁS SENSIBLES Y QUE ESTÉN AL ALCANCE DE CUALQUIER LABORATORIO. LA CIEF ES UNA PRUEBA QUE DE ACUERDO A ESTUDIOS PREVIOS EN NUESTRO LABORATORIO, HA DEMOSTRADO POSEER ESTAS CARACTERÍSTICAS POR LO QUE ES UTILIZADA RUTINARIAMENTE (46).

EL INTERÉS QUE SURGIÓ PARA DESARROLLAR EL MÉTODO DE ELISA SE DERIVA DE LA NECESIDAD DE CONTAR CON UNA TÉCNICA DE ALTA SENSIBILIDAD PARA ADAPTARLO A LA DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS EN LÍQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR (LBA) DONDE SE ENCUENTRAN EN BAJAS CONCENTRACIONES Y ASÍ REALIZAR ESTUDIOS MÁS PROFUNDOS SOBRE LA ETIOPATOGENIA DE LA ENFERMEDAD.

EL MÉTODO DE ELISA REQUIRIÓ SER ESTANDARIZADO ANTES DE SER APLICADO A LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DE PALOMA EN SUEROS DE PACIENTES, POR LO QUE FUÉ NECESARIO DETERMINAR LAS DILUCIONES ÓPTIMAS DE TRABAJO PARA EL SUERO DE PALOMA (ANTÍGENO), LOS SUEROS PROBLEMA Y CONTROLES, EL CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA Y EL VALOR DE D.O. NORMAL POR ARRIBA DEL CUAL, CUALQUIER SUE-

RO SE CONSIDERA POSITIVO. DE ACUERDO A LOS RESULTADOS OBTENIDOS SE ESTABLECIÓ ESTE VALOR EN 0.495, QUE FUÉ DETERMINADO EN BASE A LA SUMA DE LA MEDIA ARITMÉTICA DE LOS VALORES OBTENIDOS MÁS 2 VECES SU DESVIACIÓN ESTÁNDAR LO QUE IMPLICA EL 95% DE POSITIVIDAD EN LOS CASOS EN ESTUDIO. LOS SUEROS CONTROL PROBADOS PREVIAMENTE EN CIEF CON RESULTADO POSITIVO Y LOS SUEROS DE PACIENTES CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD SIEMPRE FUERON SUPERIORES A ESTE VALOR BASE CON LO QUE SE DEMOSTRÓ LA VALIDEZ DE LA PRUEBA.

PARA ESTABLECER LA ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO DE ELISA SE INTENTÓ INHIBIR LOS ANTICUERPOS PRESENTES EN UN SUERO POSITIVO CON ANTÍGENO DE PALOMA Y CON ANTI-IGG HUMANA EN UNA REACCIÓN PREVIA Y DESPUÉS PROBARLOS EN ELISA. EN LA REACCIÓN CON EL ANTÍGENO DE PALOMA SE OBSERVA QUE EFECTIVAMENTE EXISTE INHIBICIÓN DEL ANTICUERPO EL CUAL NO PUEDE ADHERIRSE POSTERIORMENTE A LA PLACA DURANTE LA REACCIÓN DE ELISA. AL DILUIR EL SUERO POSITIVO EN ESTA REACCIÓN DE INHIBICIÓN, DISMINUYE AÚN MÁS LA LECTURA DE D.O. DEMOSTRANDO QUE LA INHIBICIÓN ES MAYOR DEBIDO A QUE EXISTE MENOR CANTIDAD DE ANTICUERPO. LOS RESULTADOS DE ELISA AL UTILIZAR COMO INHIBIDOR ANTI-IGG HUMANA MUESTRAN QUE TAMBIÉN EXISTE INHIBICIÓN AÚN CUANDO ES MENOR TAL VEZ PORQUE EL ANTICUERPO ANTI-IGG HUMANA NO SÓLO RECONOCE AL ANTICUERPO HUMANO ANTI-PROTEÍNAS DE PALOMA SINO QUE TAMBIÉN REACCIONA CON EL RESTO DE LAS IGG PRESENTES EN EL SUERO. ESTE EFECTO DE INHIBICIÓN SE VE AÚN MÁS CON LAS DILUCIONES DEL ANTICUERPO ANTI-IGG DONDE SE OBSERVA QUE LA INHIBICIÓN VA SIENDO MENOR CONFORME DISMINUYE EL INHIBIDOR, ES DECIR, CUANDO LA CANTIDAD DE ANTICUERPO ANTI-IGG HUMANA DECRECE. CON ESTOS RESULTADOS SE DEMUESTRA QUE EL MÉTODO DE ELISA ES ALTAMENTE ESPECÍFICO YA QUE SÓLO RECONOCE AL ANTÍGENO DE INTERÉS Y QUE EL BLOQUEO DE ESTE IMPIDE QUE LA REACCIÓN SE LLEVE A CABO.

COMO SE MENCIONÓ ANTERIORMENTE, EL OBJETIVO FUNDAMENTAL DEL DESARROLLO DEL MÉTODO DE ELISA ES EL DE DETERMINAR ANTICUERPOS EN BAJAS CONCENTRACIONES DEBIDO A QUE TÉCNICAS COMO CIEF DEMOSTRARON POSEER BAJA SENSIBILIDAD AL ESTUDIAR LÍQUIDOS EN DONDE LA CONCENTRACIÓN DE ANTICUERPOS ES BAJA. LOS RESULTADOS DE LAS PRUEBAS REALIZADAS CON LOS SUEROS POSITIVOS EN CIEF, SE NEGATIVIZAN AL DILUIRLOS 1:10 Y 1:50, MIENTRAS QUE EN ELISA LOS SUEROS SE DILUYEN HASTA 200 VECES Y SE MANTIENEN POSITIVOS.

LA SENSIBILIDAD DEL MÉTODO DE ELISA DEMUESTRA SU MAYOR UTILIDAD EN LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS EN LBA. EL ESTUDIO COMPARATIVO REALIZADO CON 19 MUESTRAS DE PACIENTES A QUIENES SE LES REALIZÓ EL LAVADO, DEMUESTRA LA CAPACIDAD DEL MÉTODO PARA RECONOCER LOS ANTICUERPOS PRESENTES MIENTRAS QUE LA SENSIBILIDAD DE CIEF ES INSUFICIENTE PARA DEMOSTRARLOS, LO QUE PERMITE CONFIRMAR LAS VENTAJAS DE NUESTRO MÉTODO. LOS RESULTADOS QUE SE MUESTRAN EN LA TABLA # 6 PERMITEN COMPARAR LOS MÉTODOS DE CIEF Y ELISA TANTO EN SUERO COMO EN LBA:

CASI EN LA TOTALIDAD DE LOS PACIENTES ESTUDIADOS SE OBSERVA UNA CORRELACIÓN CON LA CLÍNICA: CUANDO SE DEMOSTRARON ANTICUERPOS EN EL SUERO O EN LBA, SE CONFIRMÓ EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO Y CUANDO EL RESULTADO DE LA DETERMINACIÓN FUÉ NEGATIVO, EL DIAGNÓSTICO CLÍNICO FUÉ OTRO.

EXISTEN ALGUNAS EXCEPCIONES EN DONDE ESTO NO OCURRE: EL PACIENTE NÚMERO 1 ES EL ÚNICO CASO DONDE EL MÉTODO DE ELISA PARECE NO DETERMINAR LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS EN SUERO MIENTRAS QUE CIEF SI LO HACE, POSIBLEMENTE PORQUE EL ANTICUERPO IMPLICADO EN LA REACCIÓN DE CIEF ES DE CLASE DIFERENTE A IGG, EL CUAL NO ES RECONOCIDO POR NUESTRO MÉTODO

DEBIDO A QUE ÚNICAMENTE SE UTILIZA SUERO ANTI-IGG. EN EL LBA DEL MISMO PACIENTE EN EL MÉTODO DE ELISA SÍ DÁ LA PRUEBA POSITIVA, MIENTRAS QUE EN CIEF POR SU BAJA SENSIBILIDAD ES INCAPAZ DE DEMOSTRAR LOS ANTICUERPOS.

LOS PACIENTES 3 Y 9 MOSTRARON ANTICUERPOS ANTI PROTEÍNA DE PALOMA POR LOS DOS MÉTODOS TANTO EN SUERO COMO EN LBA; AÚN ASÍ ESTOS INDIVIDUOS NO REUNIERON LOS CRITERIOS CLÍNICOS PARA EL DIAGNÓSTICO DE NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA. ESTE RESULTADO DEMUESTRA QUE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI PROTEÍNAS DE PALOMA SÓLO ES CONFIRMATIVO DE DATOS CLÍNICOS Y QUE AÚN PERSONAS SANAS O CON OTRO TIPO DE NEUMOPATÍAS PUEDEN PRESENTAR ESTOS ANTICUERPOS.

EN LOS PACIENTES 14 Y 16 EL MÉTODO DE ELISA DEMOSTRÓ SU ALTA SENSIBILIDAD YA QUE DETERMINÓ ANTICUERPOS TANTO EN EL SUERO Y EN EL LBA DEL PACIENTE 16 COMO EN EL LBA DEL PACIENTE 14 LOS CUALES NO FUERON DETERMINADOS POR CIEF. EL PACIENTE 14 NO FUÉ DIAGNOSTICADO COMO NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA POR NO REUNIR LOS CRITERIOS CLÍNICOS, MIENTRAS QUE EL RESULTADO DEL 16 CONFIRMÓ EL DIAGNÓSTICO.

POR ÚLTIMO, SE DEBE CONSIDERAR QUE DEBIDO A QUE LOS ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DE PALOMA SE PRESENTAN EN LA MAYORÍA DE LAS PERSONAS QUE TIENEN CONTACTO CON PALOMAS Y QUE SÓLO UN PEQUEÑO PORCENTAJE DE ELLOS PRESENTA LA ENFERMEDAD ACTIVA, EL MÉTODO DE ELISA QUE AQUÍ USAMOS Y OTROS QUE DETERMINAN ANTICUERPOS COMO CIEF Y HEMAGLUTINACIÓN PASIVA ENTRE OTROS, SON INCAPACES DE DISTINGUIR ENTRE PERSONAS SANAS Y ENFERMAS, POSIBLEMENTE PORQUE ÉSTOS SOLO SE DIFERENCIAN POR LA PRESENCIA O AUSENCIA DE UNA SUBCLASE DE IGG (20). SIN EMBARGO EN ESTUDIOS POSTERIORES QUE DETERMINEN ESTA DIFERENCIA, EL MÉTODO DE ELISA PUEDE SER DE GRAN UTILIDAD SI

SE MANEJA EL ANTICUERPO ESPECÍFICO PARA LA SUBCLASE IMPLICADA. TAMBIÉN SE PENSÓ QUE LA PRESENCIA DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DE PALOMA EN LBA PODÍA SER DIAGNÓSTICO DE LA ENFERMEDAD Y QUE LAS PERSONAS SANAS CON EXPOSICIÓN A PALOMAS Y ANTICUERPO SÉRICO NO PRESENTARÁN LOS ANTICUERPOS A NIVEL PULMONAR. LOS RESULTADOS OBTENIDOS EN ESTE TRABAJO NO HAN DEMOSTRADO ESTO POR LO QUE ES NECESARIO REALIZAR MÁS ESTUDIOS PARA CONFIRMAR ESTA HIPÓTESIS.

V. CONCLUSIONES.

- PARA MONTAR LA TÉCNICA DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA ES IMPORTANTE PRODUCIR UN BUEN ANTICUERPO A PARTIR DE LA INOCULACIÓN A CONEJOS CON GAMMAGLOBULINA HUMANA. EL ANTICUERPO PRODUCIDO DEBE SER PURIFICADO Y CONJUGADO A FOSFATASA AL-CALINA POR UNA TÉCNICA QUE ELIMINE AL MÁXIMO LA AUTOCONJUGACIÓN Y LA PÉRDIDA DE ACTIVIDAD TANTO DEL ANTICUERPO COMO DE LA ENZIMA.

UNA VEZ OBTENIDO EL CONJUGADO, ES IMPORTANTE ESTANDARIZARLO PARA SU USO A LA VEZ DE DETERMINAR LAS CONCENTRACIONES ÓPTIMAS DE ANTÍGENO, SUEROS DE PACIENTES Y BLOQUEADOR, PARA GARANTIZAR EL ADECUADO RENDIMIENTO DE LA PRUEBA.

- EL MÉTODO DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMA QUE SE REALIZÓ EN ESTE TRABAJO, RESULTO POSEER ALTA SENSIBILIDAD Y ESPECIFICIDAD, DEMOSTRANDO SUS VENTAJAS SOBRE OTROS MÉTODOS COMO CIEF PARA LA DETERMINACIÓN DE ESTOS ANTICUERPOS EN LÍQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR DONDE SU CONCENTRACIÓN ES MUY BAJA, LO QUE PODRÁ SER ÚTIL EN ESTUDIOS POSTERIORES DE LA ENFERMEDAD A NIVEL PULMONAR.

EL MÉTODO DE CIEF, SIN EMBARGO, MOSTRÓ LA MISMA CAPACIDAD QUE EL MÉTODO DE ELISA PARA DEMOSTRAR LOS ANTICUERPOS EN EL SUERO DE LOS PACIENTES DEBIDO A QUE EN SUERO ESTOS SE ENCUENTRAN EN CONCENTRACIONES MAYORES, DE AQUÍ QUE EL MÉTODO DE ELISA SE CONSIDERE UNA TÉCNICA VALIOSA ÚNICAMENTE EN ESTUDIOS DONDE YA SEA ANTICUERPOS O ANTÍGENOS SE ENCUENTRAN A MUY BAJAS CONCENTRACIONES.

- EL MÉTODO DE ELISA AQUÍ DESARROLLADO ES INCAPAZ DE DISCRIMINAR ENTRE INDIVIDUOS SANOS CON ANTICUERPOS Y PACIENTES CON LA ENFERMEDAD AL IGUAL QUE OTROS MÉTODOS, SIN EMBARGO, SU ALTA SENSIBILIDAD PUEDE SER ÚTIL PARA CONOCER MÁS ACERCA DE LA ENFERMEDAD.

- EL MÉTODO DE ELISA , ADEMÁS DEMOSTRÓ SER REPRODUCIBLE Y POR NO REQUERIR DE EQUIPO ESPECIALIZADO, ACCESIBLE A CUALQUIER LABORATORIO, POR LO QUE SE CONSIDERA UNA PRUEBA ADECUADA PARA SU USO EN LA DETERMINACIÓN NO ÚNICAMENTE DE ANTICUERPOS SINO TAMBIÉN DE ANTÍGENOS EN UNA GRAN VARIEDAD DE ÁREAS.

RESUMEN.

EN ESTE TRABAJO SE ADAPTA EL MÉTODO INDIRECTO DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-PROTEÍNAS DEL SUERO DE PALOMAS CON EL FIN DE CONTAR CON UNA TÉCNICA DE ALTA SENSIBILIDAD PARA EL ESTUDIO DE PACIENTES CON NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA. PARA LOGRARLO SE PRODUCE UN CONJUGADO ANTI-IGG HUMANA-FOSFATASA ALCALINA QUE SE ESTANDARIZA JUNTO CON EL MÉTODO PARA LA DETERMINACIÓN DE LOS ANTICUERPOS SÉRICOS EN DOS GRUPOS DE PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR. EL PRIMER GRUPO CON DIAGNÓSTICO CLÍNICO DE LA ENFERMEDAD Y EL SEGUNDO CON OTRO TIPO DE NEUMOPATÍAS. PARA ESTABLECER LA ESPECIFICIDAD DEL MÉTODO SE REALIZA UNA INHIBICIÓN PREVIA A LA DETERMINACIÓN POR ELISA CON ANTÍGENO DE PALOMA Y CON ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA. LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA SE OBSERVA AL COMPARARLA CON UNA TÉCNICA DE USO RUTINARIO EN EL LABORATORIO COMO LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF). EL VALOR DEL MÉTODO DESARROLLADO EN ESTE TRABAJO SE COMPRUEBA EN UN ESTUDIO COMPARATIVO DE LAS TÉCNICAS DE ELISA Y CIEF EN SUERO Y EN LÍQUIDO DE LAVADO BRONCOALVEOLAR DE DIFERENTES PACIENTES CON ENFERMEDAD PULMONAR.

POR LA GRAN CAPACIDAD QUE TIENE EL MÉTODO DE ELISA PARA LA DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS QUE SE ENCUENTRAN A MUY BAJAS CONCENTRACIONES, SE CONSIDERA UNA TÉCNICA VALIOSA PARA REALIZAR ESTUDIOS MÁS PROFUNDOS SOBRE LA ETIOPATOGENIA DE LA NEUMONITIS INTERSTICIAL POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMA.

APENDICE I

METODOS QUIMICOS

1. PRECIPITACION DE PROTEINAS CON SULFATO DE AMONIO SATURADO.

1.1 FUNDAMENTO.

LA TÉCNICA DE PRECIPITACIÓN DE PROTEÍNAS CON SULFATO DE AMONIO SATURADO SE BASA EN LA PROPIEDAD DE LAS SALES DE CAPTURAR EL AGUA DE LA SOLUCIÓN PROTEICA HASTA EL MOMENTO EN QUE LA CANTIDAD DE AGUA PRESENTE NO ES SUFICIENTE PARA MANTENER EN SOLUCIÓN A LAS MOLÉCULAS PROTEICAS, SOBREVINIENDO ASÍ LA PRECIPITACIÓN (12).

1.2 MATERIAL.

VASO DE PRECIPITADO DE 150ML.

TUBO DE CENTRÍFUGA DE PLÁSTICO DE 40ML.

PIPETA DE 10ML.

PIPETA DE 1ML.

PROBETA DE 100ML.

AGITADOR MAGNÉTICO CON MAGNETO.

CENTRÍFUGA REFRIGERADA.

MATERIAL Y EQUIPO PARA DIÁLISIS.

1.3 REACTIVOS.

SOLUCIÓN DE SULFATO DE AMONIO SATURADO (SOLUCIÓN 4.05M).

SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA CON BORATOS (SSB):

AMORTIGUADOR DE BORATOS PH 8,4-8,5

H_3BO_3	6,18G
$Na_2B_4O_7 \cdot 10H_2O$	9,53G
NaCl	4,38G
H_2O CBP.	1000ML

PARA PREPARAR LA SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA AMORTIGUADA, MEZCLAR 400ML DE ESTE AMORTIGUADOR DE BORATOS CON 8 000ML DE SOLUCIÓN SALINA ISOTÓNICA.

1.4 MÉTODO.

- SE AJUSTA EL SUERO A PH 7,0 CON HCL 0,1N O NAOH 0,1N.
- SE AÑADE SULFATO DE AMONIO SATURADO SEGÚN LA CONCENTRACIÓN FINAL DESEADA (EN ESTE CASO 50%).
LA ADICIÓN DE SULFATO DE AMONIO SATURADO SE HACE SOBRE BAÑO DE HIELO, GOTA A GOTA EN AGITACIÓN CONSTANTE, EVITANDO LA FORMACIÓN DE ESPUMA.
- SE DEJA EN AGITACIÓN DURANTE 30 MINUTOS PARA ELIMINAR MECÁNICAMENTE LAS PROTEÍNAS NO DESEADAS QUE HAYAN QUEDADO ENGLOBADAS EN EL PRECIPITADO.
- SE CENTRIFUGA A 1 000XG A 4°C DURANTE 30 MINUTOS Y SE DESECHA EL SOBRENADANTE.
- SE LAVA EL PRECIPITADO DOS VECES CON SULFATO DE AMONIO AL 50%.
- SE RESUSPENDE CON SSB EN LA MITAD DEL VOLUMEN ORIGINAL DEL SUERO.
- SE DIALIZA CONTRA SSB HASTA LA ELIMINACIÓN DEL SULFATO DE AMONIO.

2. CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO IONICO EN COLUMNA DE DEAE CELULOSA (18).

2.1 FUNDAMENTO.

SE BASA EN EL INTERCAMBIO REVERSIBLE DE IONES EN SOLUCIÓN CON IONES ELECTROSTÁTICAMENTE UNIDOS A UN MEDIO SOPORTE INSOLUBLE. LAS MATRICES GENERALMENTE USADAS EN LA SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS SON POLÍMEROS DE DEXTRANAS, POLIACRILAMIDA Y LOS DERIVADOS CARGADOS DE LA CELULOSA. EL VALOR DE ESTA TÉCNICA EN EL AISLAMIENTO Y SEPARACIÓN DE COMPUESTOS CARGADOS, ESTriba EN QUE PUEDEN ENCONTRARSE LAS CONDICIONES BAJO LAS CUALES ALGUNOS COMPUESTOS SE UNEN ELECTROSTÁTICAMENTE A UNA MATRIZ MIENTRAS QUE OTROS EN ESTAS MISMAS CONDICIONES NO LO HACEN. LA ELUCIÓN DE LAS PROTEÍNAS PUEDE LOGRARSE YA SEA CAMBIANDO EL PH DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA QUE ES PASADA POR LA COLUMNA AFECTANDO ASÍ LA CARGA DE LAS MOLÉCULAS DE PROTEÍNA, O INCREMENTANDO LA MOLARIDAD DE LA MISMA, LO QUE RESULTA EN UNA MAYOR CANTIDAD DE IONES QUE COMPITEN CON LAS PROTEÍNAS POR LOS GRUPOS CARGADOS EN LA CELULOSA; DE ESTA MANERA SE PUEDEN FRACCIONAR SELECTIVAMENTE LA SALIDA DE LAS DIFERENTES PROTEÍNAS A TRAVÉS DE LA COLUMNA.

LA COLUMNA DE DEAE CELULOSA ES UNA COLUMNA ANIÓNICA, ES DECIR, ES CAPAZ DE RETENER IONES NEGATIVOS DEBIDO A LA CARGA POSITIVA DEL GRUPO DIETILAMINOETIL QUE ESTÁ UNIDO A LA MATRIZ DE CELULOSA. AL HACER PASAR LA SOLUCIÓN DE PROTEÍNAS OBTENIDA POR PRECIPITACIÓN CON SULFATO DE AMONIO SATURADO, EN UNA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.01M PH 8.0, LA COLUMNA RETENDRÁ TODAS LAS PROTEÍNAS CARGADAS NEGATIVAMENTE DEJANDO PASAR UNICAMENTE GAMMAGLOBULINAS, EN SU MAYORÍA IGG.

2.2 MATERIAL.

EMBUDO BUCHNER DE 10CM DE DIÁMETRO,
 MATRAZ KITASATO DE 500ML CON TAPÓN DE HULE.
 VASO DE PRECIPITADO DE 500ML.
 HOJA DE PAPEL WHATMAN Nº.1.
 BOMBA DE VACIO.
 AGITADOR MAGNÉTICO CON MAGNETO.
 BALANZA GRANATARIA.
 COLUMNA DE PLÁSTICO DE 60CM DE LONGITUD Y 1CM DE DIÁMETRO.
 ESPECTROFOTÓMETRO DE LUZ U.V.
 POTENCIÓMETRO.

2.3 REACTIVOS.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.01M PH 8.0:

KH_2PO_4 ANH.	0.191g
K_2HPO_4 ANH.	1.498g
H_2O CBP.	1000ML

2.4 MÉTODO.

- LA MATRIZ DE DEAE CELULOSA (DE FUENTE COMERCIAL PREVIAMENTE HINCHADA), SE LAVA VARIAS VECES CON SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.01M PH 8.0 EN UN EMBUDO BUCHNER HASTA QUE EL PH DE LA SOLUCIÓN FILTRADA SEA IGUAL A 8.0.
- SE MONTA LA COLUMNA VERTICALMENTE Y SE VIERTI LA MATRIZ DE CELULOSA DEJÁNDOLA SEDIMENTAR TOTALMENTE.
- SE ABRE EL TUBO DE SALIDA Y SE PASAN 2ML DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA, LA CUÁL SE USARÁ COMO BLANCO EN LA LECTURA DE LAS MUESTRAS CON EL ESPECTROFOTÓMETRO.
- SE DESECHA EL AMORTIGUADOR DE LA PARTE SUPERIOR DE LA COLUMNA ABRIENDO EL TUBO DE SALIDA Y SE AGREGAN 10ML DE MUES-

TRA PREVIAMENTE EQUILIBRADA CON EL MISMO AMORTIGUADOR, EN LA PARTE SUPERIOR DE LA COLUMNA.

- UNA VEZ QUE LA MUESTRA HA PENETRADO EN LA MATRIZ DE CELULO-SA, SE LAVA CON EL AMORTIGUADOR Y SE COLECTAN FRACCIONES DE 2ML CADA UNA.
- SE MIDE LA ABSORBANCIA DE LAS FRACCIONES A 280NM Y SE COLEC TAN LAS QUE TENGAN UNA ABSORBANCIA MAYOR A 0.1.

3. CUANTIFICACION DE PROTEINAS POR EL METODO DE LOWRY (34,13,14).

3.1 FUNDAMENTO.

ESTE MÉTODO SE BASA EN LA REDUCCIÓN DEL REACTIVO DE FOLIN-CIOCALTEAU O REACTIVO DE FENOL (SALES LÍTICAS DEL ÁCIDO FOSFOMOLIBDOTÚNGSTICO), EN UNA SOLUCIÓN ALCALINA POR LA PRESENCIA DE LOS GRUPOS FENÓLICOS DE LA TIROSINA DE LAS PROTEÍNAS. LOS GRUPOS INDOL E IMIDAZOL DE TRIPTOFANO E HISTIDINA, REACCIONAN TAMBIÉN PERO MÁS DÉBILMENTE. LA REACCIÓN PREVIA DE LAS PROTEÍNAS CON UNA PEQUEÑA CANTIDAD DE IÓN CÚPRICO AUMENTA LA SENSIBILIDAD DE LA PRUEBA YA QUE EL COMPLEJO TIPO BIURET FORMADO ENTRE COBRE Y PROTEÍNA JUNTO CON LOS GRUPOS AROMÁTICOS DE LA PROTEÍNA REDUCIRÁN AL REACTIVO DE FENOL ADICIONADO EN EL SIGUIENTE PASO DE LA REACCIÓN.

3.2 MATERIAL.

TUBOS DE 12x75MM.

VASO DE PRECIPITADO DE 50ML.

PIPETA DE 10ML.

PIPETA DE 1ML.

GRADILLA PARA TUBOS DE 12x75MM.

ESPECTROFOTÓMETRO DE LUZ VISIBLE.

APENDICE II

METODOS INMUNOQUIMICOS

1. INMUNOELECTROFORESIS (IEF) (54).

1.1 FUNDAMENTO.

LA IEF ES UNA TÉCNICA POR LA CUAL LAS PROTEÍNAS SON SEPARADAS EN UN GEL DE AGAROSA DE ACUERDO A SU CARGA ELÉCTRICA AL EXPONERLAS A LA CORRIENTE DE UN CAMPO ELÉCTRICO. DESPUÉS DE LA SEPARACIÓN, SE HACEN REACCIONAR CON SUS CORRESPONDIENTES ANTICUERPOS LO QUE RESULTA EN UNA SERIE DE BANDAS DE PRECIPITACIÓN INDIVIDUALES.

1.2 MATERIAL.

CÁMARA DE ELECTROFORESIS.

APARATO DE ELECTROFORESIS.

PORTAOBJETOS.

TIRAS DE PAPEL WHATMAN NO.1.

PIPETA PASTEUR.

VASO DE PRECIPITADO DE 100ML.

PIPETA DE 5ML.

CAPILARES.

SUPERFICIE NIVELADA CON NIVEL DE GOTA.

BALANZA GRANATARIA.

1.3 REACTIVOS.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE BARBITAL PH 8.2, FUERZA IÓNICA 0.05

BARBITAL SÓDICO	15.87g
HCL 0.1N	230.00ML
H ₂ O CBP	2000.00ML

SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATOS 0.01M PH 7.3 (SSAF)

Na_2HPO_4 ANH.	0.781g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.621g
NaCl	8.76g
H_2O CBP	1000 ML

SOLUCIÓN DE AZUL DE BROMOFENOL AL 1% EN SOLUCIÓN DE ASB
AL 1% EN SSAF.

AGAROSA 1% EN AMORTIGUADOR DE BARBITAL.

AGAROSA 0.1% EN AGUA DESTILADA PARA SELLAR.

1.4 MÉTODO.

- SE LLENA LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS CON LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA Y SE IGUALAN LOS NIVELES.
- SE RECUBREN LOS PORTAOBJETOS CON UNA CAPA DELGADA DE LA SOLUCIÓN SELLADORA DE AGAROSA.
- SE FUNDE LA AGAROSA AL 1% Y SE PONEN 3ML EN CADA PORTA-OBJETOS QUE SE ENCUENTRAN SOBRE UNA SUPERFICIE NIVELADA. SE DEJA SOLIDIFICAR.
- SE PONE EL PORTAOBJETOS SOBRE UN PATRÓN COMO SE MUESTRA EN LA FIGURA Y SE PERFORA EL GEL. SE RETIRA EL AGAR DE LOS POZOS, SIN QUITAR EL DE LOS CANALES.

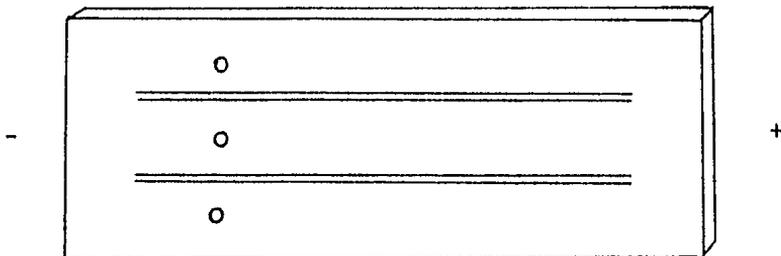


FIG. 11

- SE APLICAN LAS MUESTRAS EN LOS POZOS.

- SE PONEN LAS PLACAS EN LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS ASEGURÁNDOSE DE QUE LAS TIRAS DE PAPEL FILTRO ESTÉN EN CONTACTO TANTO CON LA ORILLA DEL GEL COMO CON LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA CON EL OBJETO DE QUE EL CIRCUITO QUEDE CERRADO AL APLICAR LA CORRIENTE ELÉCTRICA.
- SE CONECTA LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS A UNA FUENTE DE PODER APLICANDO 6V POR CM DURANTE 2 HORAS. PARA DEMOSTRAR EL CORRIMIENTO DE LAS PROTEÍNAS SE APLICA EN UN POZO ADYACENTE AL DE LA MUESTRA UNA SOLUCIÓN DE AZUL DE BROMOFENOL AL 1% EN UNA SOLUCIÓN DE ASB AL 1% EN SSAF.
- AL TÉRMINO DEL CORRIMIENTO SE RETIRA EL GEL DEL CANAL Y SE LLENA CON EL SUERO INMUNE ESPECÍFICO, SE DEJA DIFUNDIR HASTA EL DÍA SIGUIENTE EN UNA CÁMARA HÚMEDA A TEMPERATURA AMBIENTE Y SE LEEN LOS RESULTADOS.

2. INMUNODIFUSION DOBLE (IDD). METODO DE OUCHTERLONY (14).

2.1 FUNDAMENTO.

LA TÉCNICA SE BASA EN LA DIFUSIÓN DEL ANTÍGENO Y SU ANTICUERPO EN EL SENO DE UN GEL DE AGAR. LA DIFUSIÓN ES DIRECTAMENTE PROPORCIONAL A LA CONCENTRACIÓN E INVERSAMENTE PROPORCIONAL AL PESO MOLECULAR DEL ANTÍGENO Y DEL ANTICUERPO. EN EL MOMENTO EN QUE ÉSTOS SE ENCUENTRAN EN CONCENTRACIONES EQUIVALENTES, REACCIONAN FORMANDO UNA O VARIAS BANDAS DE PRECIPITACIÓN VISIBLES DEPENDIENDO DEL NÚMERO DE SISTEMAS ANTÍGENO-ANTICUERPO PRESENTES.

2.2 MATERIAL.

VASO DE PRECIPITADO DE 100ML.

PIPETAS DE 5ML.

PLANCHA TÉRMICA O MECHERO CON TRIPIE Y TELA DE ALAMBRE.

CAJA DE PLÁSTICO TRANSPARENTE DE 5CM DE DIÁMETRO,
CAPILARES,
BALANZA GRANATARIA,
SUPERFICIE NIVELADA CON NIVEL DE GOTA.

2.3 REACTIVOS.

SOLUCIÓN SALINA AMORTIGUADA CON FOSFATOS 0.01M PH 7.3 (SSAF)
(APÉNDICE II, 1.3)

AGAROSA 0.4% EN SSAF Y AZIDA DE SODIO 0.1%
CITRATO DE SODIO 0.17M.

2.4 MÉTODO.

- SE COLOCA LA CAJA DE PLÁSTICO EN UNA SUPERFICIE NIVELADA Y SE LLENA CON 5ML DE AGAROSA 0.04% FUNDIDA, SE DEJA SOLIDIFICAR POR 20 MINUTOS.
- SE CORTAN POZOS DE 5MM DE DIÁMETRO Y DISTANCIA ENTRE LOS POZOS DE 5MM, DE ACUERDO A LA SIGUIENTE FIGURA:

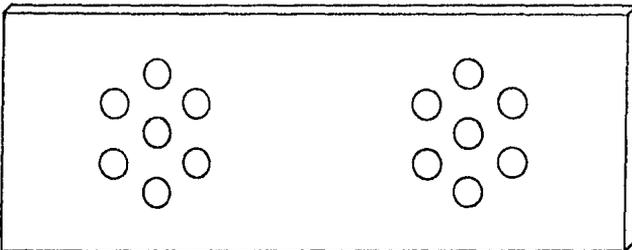


FIG. 12

- SE REMUEVE EL AGAR DE LOS POZOS POR SUCCIÓN.
- SE LLENAN LOS POZOS PERIFÉRICOS CON DILUCIONES SERIADAS (1:2, 1:4, 1:8, ETC.) DEL ANTICUERPO Y EL POZO CENTRAL CON EL ANTÍGENO.
- SE DEJA DIFUNDIR POR 24 HORAS A TEMPERATURA AMBIENTE.
- SE HACE LA LECTURA CON LUZ DIRECTA Y FONDO OSCURO. EL TÍTULO DE ANTICUERPOS SERÁ LA MÁXIMA DILUCIÓN EN DONDE TODAVÍA SE PRESENTE UNA BANDA DE PRECIPITACIÓN.
- SE LAVA CON CITRATO DE SODIO 0,17M Y SE LEE NUEVAMENTE.

3. PURIFICACION ESPECIFICA DE ANTICUERPOS ANTI-IGG HUMANA (3).

3.1 FUNDAMENTO.

LA TÉCNICA SE BASA EN LA REVERSIBILIDAD DE LA REACCIÓN ENTRE EL ANTÍGENO Y SU ANTICUERPO. EL PRIMER PASO CONSISTE EN HACER REACCIONAR LOS ANTICUERPOS EN SOLUCIÓN CON SU ANTÍGENO ESPECÍFICO QUE SE ENCUENTRA EN FORMA INSOLUBLE. SE LAVA PARA ELIMINAR LAS PROTEÍNAS QUE NO SE ADHIEREN Y QUE QUEDAN EN SOLUCIÓN. LOS ANTICUERPOS SE SEPARAN DE SU ANTÍGENO BAJANDO EL PH DE LA SOLUCIÓN EN QUE SE ENCUENTRAN.

3.2 MATERIAL.

BALANZA ANALÍTICA.

VASO DE PRECIPITADO DE 50ML.

PIPETAS DE 10ML.

PIPETA DE 1ML.

CENTRÍFUGA.

TUBO PARA CENTRÍFUGA DE 40ML.

HOMOGENIZADOR MANUAL TIPO POTTER.

ESPECTROFOTÓMETRO DE LUZ U.V.

MEMBRANAS FILTRANTES DE 0.45 MICRONES DE DIÁMETRO DE PORO.

3.3 REACTIVOS.

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.1M PH 7.0

NAH ₂ PO ₄ H ₂ O	8.536G
NA ₂ HPO ₄ ANHIDRO	5.395G
H ₂ O CBP	1000 ML

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.2M PH 7.2

NAH ₂ PO ₄ H ₂ O	13.96G
NA ₂ HPO ₄ ANHIDRO	14.04G
H ₂ O CBP	1000 ML

GLUTARALDEHÍDO AL 2.5%

GAMMAGLOBULINA HUMANA (DE FUENTE COMERCIAL).

SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE GLICINA-HCL 0.1M PH 2.8

SE PREPARA UNA SOLUCIÓN DE GLICINA 0.1M (7.51g EN 100ML) Y SE LLEVA A PH 2.8 CON UNA SOLUCIÓN DE HCL 0.1N.

SOLUCIÓN SALINA FISIOLÓGICA AMORTIGUADA CON FOSFATOS 0.01M PH 7.3 (SSAF).

(APÉNDICE II, 1.3)

3.4 MÉTODO.

- INSOLUBILIZACIÓN DE IGG.

SE DISUELVEN 500MG DE GAMMAGLOBULINA HUMANA DE FUENTE COMERCIAL EN 10ML DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.1M PH 7.0 Y SE AÑADE GOTA A GOTA 1ML DE GLUTARALDEHÍDO AL 2.5%. SE DEJA REPOSAR DURANTE 3 HRS. A TEMPERATURA AMBIENTE PARA QUE SE FORME UNA MATRIZ INSOLUBLE DE PROTEÍNAS.

SE LAVA LA MATRIZ CON AGUA HASTA LA ELIMINACIÓN DE TODA LA PROTEÍNA QUE HAYA QUEDADO EN SOLUCIÓN.

- PURIFICACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-IGG.

SE RESUSPENDEN 500MG DE LA PROTEÍNA INSOLUBLE EN 200ML DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.2M PH 7.2. SE HOMOGENIZAN EN TRES OCASIONES Y SE LAVA CON 200ML DE SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE GLICINA-HCL 0.1M PH 2.8. EL INMUNO ADSORBENTE SE LAVA CON LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE FOSFATOS 0.2M PH 7.2 HASTA QUE EL SOBRENADANTE TENGA UNA LECTURA DE D.O. DE 0.00 A 280NM.

SE AÑADEN 20ML DE SUERO ANTI-IGG, SE MEZCLA Y AGITA POR 30 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE, SE CENTRIFUGA A 31 000XG 30 MINUTOS A 4°C. EL PRECIPITADO SE RESUSPENDE EN SSAF Y SE LAVA EN TRES OCASIONES CON 3-4 VECES EL VOLUMEN DE SUERO UTILIZADO, HASTA QUE EL SOBRENADANTE TENGA UNA LECTURA DE D.O. MENOR A 0.040 A 280NM.

LOS ANTICUERPOS SE ELUYEN CON 4ML DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA DE GLICINA-HCL PH 2.8 AGITANDO 10 MINUTOS A TEMPERATURA AMBIENTE. SE CENTRIFUGA A 12 000XG 15 MINUTOS A 4°C. LA OPERACIÓN SE REPITE 2-3 VECES. LOS SOBRENADANTES OBTENIDOS SE PASAN POR MEMBRANA FILTRANTE DE 0.45 M

4. CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIEF).

4.1 FUNDAMENTO.

LA CIEF ES UNA TÉCNICA INMUNOLÓGICA DE DOBLE DIFUSIÓN EN GEL SIMILAR A LA TÉCNICA DE OUCHTERLONY, A DIFERENCIA DE ÉSTA, HAY APLICACIÓN DE UN CAMPO ELÉCTRICO EN DONDE EL ANTÍGENO, QUE DEBE TENER CARGA NEGATIVA, MIGRA HACIA EL ÁNODO Y EL ANTICUERPO HACIA EL CÁTODO FAVORECIDO POR EL EFECTO ELECTROENDOSMÓTICO (EEO). CUANDO EL ANTÍGENO Y EL ANTICUERPO SE ENCUENTRAN EN CONCENTRACIONES EQUIVALENTES, SE FORMAN UNA O VA-

RIAS LÍNEAS DE PRECIPITACIÓN, DEPENDIENDO DEL NÚMERO DE SISTEMAS ANTÍGENO-ANTICUERPO QUE EXISTAN.

EL EEO SE PRODUCE POR LA EXISTENCIA DE CARGAS NEGATIVAS SOBRE LA SUPERFICIE DE LA AGAROSA, LAS CUALES ATRAEN IONES DE CARGA CONTRARIA, HACIENDO QUE LA CAPA DE LÍQUIDO QUE SE ENCUENTRA ESTRECHAMENTE EN CONTACTO CON LA SUPERFICIE DEL GEL ADQUIERA UNA CARGA NETA OPUESTA. AL SOMETER ESTE SISTEMA A UN CAMPO ELÉCTRICO, SE GENERA UNA FUERZA ELÉCTRICA QUE ACTÚA SOBRE ESTE LÍQUIDO CARGADO POSITIVAMENTE (H_3O^+), EL CUAL MIGRA HACIA EL CÁTODO ARRASTRANDO LOS ANTICUERPOS QUE PRESENTAN UNA CARGA NEGATIVA DÉBIL MIENTRAS QUE EL ANTÍGENO CON CARGA NEGATIVA MUY ALTA MIGRA HACIA EL ÁNODO, Y NO SERÁ INFLUENCIADO GRANDEMENTE POR ÉSTE EFECTO. ESTE FENÓMENO DEPENDE EN CIERTO GRADO DE LA COMPOSICIÓN Y CONCENTRACIÓN DE LA SOLUCIÓN AMORTIGUADORA POR LO QUE SE UTILIZA DIFERENTE FUERZA IÓNICA EN EL GEL DE AGAROSA (0,025) Y EN LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS (0,05), PERO DEPENDE MÁS AMPLIAMENTE DE LA PUREZA DEL AGAR EMPLEADO (39,40,49,54).

4.2 MATERIAL.

VASO DE PRECIPITADO DE 100ML.

PIPETA DE 5ML.

PORTAOBJETOS.

CAPILARES.

SUPERFICIE NIVELADA CON NIVEL DE GOTA.

BALANZA GRANATARIA.

TIRAS DE PAPEL WHATMAN. No.1.

CÁMARA DE ELECTROFORESIS.

APARATO DE ELECTROFORESIS.

4.3 REACTIVOS.

SOLUCIÓN DE BARBITAL PH 8.6, FUERZA IÓNICA 0.05.

BARBITAL SÓDICO	18g
HCL IN	13ML
AZIDA DE SODIO	1g
H ₂ O CBP	2000 ML

HACER UNA DILUCIÓN 1:2 PARA DISOLVER LA AGAROSA.

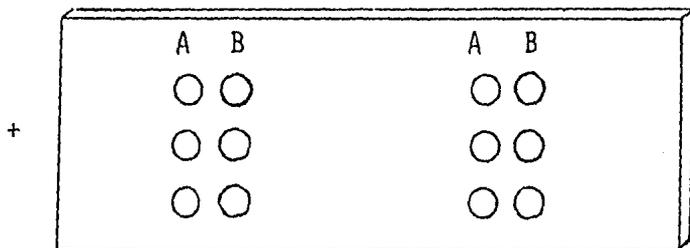
SOLUCIÓN DE CITRATO DE SODIO 0.17M.

AGAROSA 0.1% EN AGUA DESTILADA PARA SELLAR.

AGAROSA 0.6% EN SOLUCIÓN DE BARBITAL PH 8.6, FUERZA IÓNICA 0.025, CONTENIENDO EDTA 0.01M.

4.4 MÉTODO.

- SE RECUBREN LOS PORTAOBJETOS CON UNA CAPA DELGADA DE LA SOLUCIÓN SELLADORA DE AGAROSA.
- SE FUNDE LA AGAROSA AL 0.6% POR CALENTAMIENTO EN UN BAÑO HIRVIENTE Y SE DEPOSITAN 3ML EN CADA LAMINILLA SOBRE UNA SUPERFICIE NIVELADA, SE DEJA SOLIDIFICAR Y SE PONEN EN REFRIGERACIÓN EN CÁMARA HÚMEDA POR 20 MINUTOS.
- SE CORTAN LOS POZOS DE 3MM DE DIÁMETRO CON UNA DISTANCIA ENTRE ELLOS DE 5MM DE ACUERDO A LA FIGURA Y SE RETIRA EL AGAR POR SUCCIÓN.



A: SITIOS DE APLICACIÓN PARA LOS ANTICUERPOS.

B: SITIOS DE APLICACIÓN PARA LOS ANTÍGENOS.

FIG. 13

- SE LLENAN LOS POZOS CON EL ANTÍGENO Y EL ANTICUERPO, USANDO AZUL DE BROMOFENOL-ALBÚMINA COMO INDICADOR DEL CORRI-MIENTO DEL LADO DEL CÁTODO. SE MONTAN LAS LAMINILLAS EN LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS, COLOCANDO EL ANTÍGENO EN EL LADO DEL CÁTODO Y EL ANTICUERPO DEL LADO DEL ÁNODO. LA CÁMARA DE ELECTROFORESIS SE LLENA CON EL AMORTIGUADOR DEL BARBITAL PH 8.6, FUERZA IÓNICA 0.05 Y SE IGUALAN LOS NIVELES.
- SE DEJAN CORRER CON 90-100V HASTA QUE EL COLORANTE SE DES-PLACE HASTA EL POZO DEL ANTICUERPO. SE LEEN INMEDIATA-MENTE.
- SE DEJAN EN CÁMARA HÚMEDA A TEMPERATURA AMBIENTE HASTA EL DÍA SIGUIENTE Y SE LEEN NUEVAMENTE.
- SE LAVAN CON CITRATO DE SODIO 0.17M DURANTE UNA HORA Y SE LEEN DE NUEVO.

BIBLIOGRAFIA.

1. ALARCÓN-SEGOVIA, D., RUÍZ-ARGUELLES, A., LLORENTE, L.:
ANTIBODY PENETRATION INTO LIVING CELLS. II.
ANTIRIBONUCLEOPROTEIN IGG PENETRATES INTO T γ
LYMPHOCYTES CAUSING THEIR DELATION AND ABRO-
GATION OF SUPRESSOR FUNCTION. J. IMMUNOL,
122:1855, (1979).
2. AVRAMEAS, S.: COUPLING OF ENZYMES TO PROTEINS WITH GLU-
TARALDEHYDE. USE OF THE CONJUGATES FOR THE
DETECTION OF ANTIGENS AND ANTIBODIES. IMMU-
NOCHEMISTRY 6:43, (1969).
3. AVRAMEAS, S., TERNINCK, T.: THE CROSS-LINKING OF PROTEINS
WITH GLUTARALDEHYDE AND ITS USE FOR THE PRE-
PARATION OF IMMUNOADSORBENTS. IMMUNOCHEMIS-
TRY 6:53, (1969).
4. AVRAMEAS, S., TERNINCK, T.: PEROXIDASE LABELED ANTIBODY
AND FAB CONJUGATES WITH ENHANCED INTRACELU-
LAR PENETRATION. IMMUNOCHEMISTRY 8:1175,
(1971).
5. AVRAMEAS, S., TERNINCK, T., GUESDON, J. L.: SOME GENERAL
REMARKS ABOUT IMMUNOENZYMATIC TECHNIQUES.
FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOENZY-
MATIC TECHNIQUES, INSERM SYMPOSIUM No.2.
FELDMAN ET AL. EDITORES, NORTH-HOLLAND PU-
BLISHING Co., AMSTERDAM PÁG. 1 (1976).
6. BARBORIAK, J. J., SOSMAN, A. J., REED, C. E.: SEROLOGIC
STUDIES IN PIGEON BREEDER'S DISEASE. J. LAB.

CLIN. MED. 65:600, (1965).

7. BIDWELL, D. E., ET AL.: THE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) BULL. WORLD HEALTH ORGAN. 54:129, (1976).
8. BLOMBÄCK, B., HANSON, L. A. PLASMA PROTEINS, JOHN WILEY AND SONS, CHICHESTER/NEW YORK/BRISBANE/TORONTO PÁG. 45 (1979).
9. CALDWELL, J. R., PEARCE, D. E., SPENCER, C., LEDER, R., WALDMAN, R. H.: IMMUNOLOGIC MECHANISMS IN HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS. I. EVIDENCE FOR CELL MEDIATED IMMUNITY AND COMPLEMENT FIXATION IN PIGEON BREEDER'S DISEASE. J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL. 52:225, (1973).
10. CHAPELA, R., COMUNICACIÓN PERSONAL.
11. COOMBS, R. R. A., GELL, P. G. H., CLASIFICACION OF ALLERGIC REACTIONS RESPONSIBLE FOR CLINICAL HYPERSENSITIVITY AND DISEASE, CAP. 25 EN GELL, P.G.H., COOMBS, R.R.A., LACHMANN, P.J. EDITORES, CLINICAL ASPECTS OF IMMUNOLOGY, 3A. EDICIÓN, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD/LONDON/EDINBURG/MELBOURNE PÁG. 761 (1975).
12. COOPER, T. G. THE TOOLS OF BIOCHEMISTRY, JOHN WILEY AND SONS, NEW YORK/LONDON/SYDNEY/TORONTO (1977).
13. DAVIDSOHN, I., HENRY, J.B. DIAGNÓSTICO CLÍNICO POR EL LABORATORIO, 6A. EDICIÓN, SALVAT EDITORES, S.A. BARCELONA PÁG. 580 (1978).

14. DE LEÓN, CH. S. HIPERSENSIBILIDAD CELULAR EN CISTICERCOSIS EXPERIMENTAL, TESIS. FACULTAD DE QUÍMICA. UNAM. MÉXICO, D.F. (1981).
15. ENGVALL, E., PERLMAN, P.: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA). QUANTITATIVE ASSAY OF IMMUNOGLOBULIN G. IMMUNOCHEMISTRY 8:871, (1971).
16. ENGVALL, E., PERLMAN, P.: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, ELISA. III. QUANTITATION OF SPECIFIC ANTIBODIES BY ENZYME-LABELED ANTI-IMMUNOGLOBULIN IN ANTIGEN-COATED TUBES. J. IMMUNOL. 109:129, (1972).
17. ENGVALL, E., PESCE, A.J.: QUANTITATIVE ENZYME IMMUNOASSAYS. SCAND. J. IMMUNOL. SUPPL. No.7 8:23 (1978).
18. FAHEY, J. L., TERRY, E. W.: ION EXCHANGE CROMATOGRAPHY AND GEL FILTRATION, CAP.8 EN WEIR, D.M. EDITOR, HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY, VOL. I 3A. EDICIÓN, BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD/LONDON/EDINBURGH/MELBOURNE PÁG. 8:1 (1978).
19. FINK, J.N., BARBORIAK, J.J., SOSMAN, A.J.: IMMUNOLOGIC STUDIES OF PIGEON BREEDER'S DISEASE. J. ALLERGY 39:214, (1967).
20. FINK, J.N., BARBORIAK, J.J., BUKOSKY, R.J., ARKINS, J. A.: ANTIBODIES AGAINST PIGEON SERUM PROTEINS IN PIGEON BREEDERS. J. LAB. CLIN. MED. 71:20 (1968).

21. FINK, J.N., TEBO, T., BARBORIAK, J.J.: CHARACTERIZATION OF HUMAN PRECIPITATING ANTIBODY TO INHALED ANTIGENS. J. IMMUNOL. 103:244, (1969).
22. FINK, J.N., TEBO, T., BARBORIAK, J.J.: DIFFERENCES IN THE IMMUNO RESPONSES OF PIGEON BREEDER'S TO SERUM PROTEINS. J. LAB. CLIN. MED. 74:325, (1969).
23. FINK, J.N., SOSMAN, A.J., SALVAGGIO, J.E., BARBORIAK, J.J.: PRECIPITINS AND THE DIAGNOSIS OF HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS. J. ALLERGY 48: 179, (1971).
24. FLAHERTY, D., BARBORIAK, J.J., EMMANUEL, D.: MULTILABORATORY COMPARISON OF THE THREE IMMUNODIFFUSION METHODS USED FOR THE DETECTION OF PRECIPITATING ANTIBODIES IN HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS. J. LAB. CLIN. MED. 84:298, (1974).
25. FORD, D.J., RADIN, R., PESCE, A.J.: CHARACTERIZATION OF GLUTARALDEHYDE COUPLED ALKALINE PHOSPHATASE-ANTIBODY AND LACTOPEROXIDASE-ANTIBODY CONJUGATES. IMMUNOCHEMISTRY 15:237, (1978).
26. FREDERICKS, W.: ANTIGENS IN PIGEON DROPPING EXTRACTS, EN FINK, J.N., SALVAGGIO, J. EDITORES; NIAID WORKSHOP ON ANTIGENS IN HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS. J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL. 61: 221, (1978).
27. FRICK, O.L., HIPERSENSIBILIDAD INMEDIATA, CAP. 22 EN

- FUDENBERG, H.H. Y COLS. MANUAL DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA. 2A. EDICIÓN. EDITORIAL EL MANUAL MODERNO, S.A. MÉXICO PÁG. 274, (1980).
28. GOUDIE, R.B., HORNE, C.H.W., WILKINSON, P.C.: A SIMPLER METHOD FOR PRODUCING ANTIBODY SPECIFIC TO A SINGLE SELECTED DUFFUSIBLE ANTIGEN. LANCET 11:1224, (1966).
29. HARGREAVE, R.E., PEPYS, J., LONGBOTTOM, J., WRAITH, D. G.: BIRD BREEDER'S (FANCIERS) LUNG. LANCET 1:445, (1966).
30. HENNEY, C.S., GILLS, S.: CELL-MEDIATED CYTOTOXICITY, CAP. 25 EN PAUL, W.E. EDITOR, FUNDAMENTAL IMMUNOLOGY. RAVEN PRESS, NEW YORK PÁG. 669, (1984).
31. ISHIKAWA, E., ET AL.: ENZYME-LABELING ANTIBODIES AN THEIR FRAGMENTS FOR ENZYME IMMUNOASSAY AND IMMUNO-HISTOCHEMICAL STAINING. J. IMMUNOASSAY 4:209 (1983).
32. ISHIZAKA, K., EXPERIMENTAL ANAPHILAXIS AND REAGINIC HYPERSENSITIVITY, CAP.9 EN SAMTER, M. EDITOR, IMMUNOLOGICAL DISEASES, VOL. I, 3A. EDICIÓN. LITTLE, BROWN AND Co. PÁG. 164 (1978).
33. KARR, R.M., SALVAGGIO, J.E., INFILTRATIVE HYPERSENSITIVITY DISEASE OF THE LUNG, CAP. 44 EN PARKER C. W. EDITOR, CLINICAL IMMUNOLOGY, VOL. II, W.B. SAUNDERS Co. PHILADELPHIA/LONDON/TORONTO PÁG. 1336 (1980).

34. LOWRY, O.H., ROSEBROUGH, N.J., FARR, A.L., RANDALL, R. J.: PROTEIN MEASUREMENT WITH THE FOLIN PHENOL REAGENT. J. BIOL. CHEM. 193:265, (1951).
35. MOLINA, C., BRUN, J., AIACHE, J.M., JEANNERET, A.: CAUSES OF EXTRINSIC ALLERGIC ALVEOLITIS. PROGRESS IN IMMUNOLOGY 4:261, (1974).
36. MOORE, V.: HUMORAL AND CELULAR IMMUNOLOGIC ASPECTS OF HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS, EN FINK J.N., SALVAGGIO, J. EDITORES, NIAID WORKSHOP ON ANTIGENS IN HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS, J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL. 61:210, (1978).
37. MOORE, V.L., FINK, J.N., BARBORIAK, J.J., RUFF, L.L., SCHLUETER, D.P.: IMMUNOLOGIC EVENTS IN PIGEON BREEDER'S DISEASE. J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL. 53:319, (1974).
38. NAKANE, P.D., KAWAOI, A.: PEROXIDASE-LABELED ANTIBODY. A NEW METHOD OF CONJUGATION. J. HISTOCHEM AND CYTOCHEM. 22:1084, (1974).
39. NEREMBERG, S.T. ELECTROFORESIS. MANUAL PRÁCTICO DE LABORATORIO. EDITORIAL JIMS BARCELONA PÁG.189 (1968).
40. PHARMACIA FINE CHEMICALS. AGAROSE IEF. A SUPPORTING MATRIX FOR ISOELECTRIC FOCUSING. SUECIA (1980).
41. PHARMACIA FINE CHEMICALS. ION EXCHANGE CHROMATOGRAPHY,

PRINCIPLES AND METHODS. SUECIA (1980).

42. PEPYS, J. PULMONARY ASPERGILLOSIS, FARMERS LUNG, AND RELATED DISEASES, CAP. 37 EN SAMTER, M. EDITOR, IMMUNOLOGICAL DISEASES, VOL. I, 3A. EDICIÓN. LITTLE, BROWN AND Co. PÁG. 692 (1978).
43. PESCE, A. J., MODESTO, R.R., FORD, D.J., SEITH, K., CLYNE, D.H., POLLAK, V.E.: PREPARATION AND ANALYSIS OF PEROXIDASE ANTIBODY AND ALKALINE PHOSPHATASE ANTIBODY CONJUGATES. FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOENZYMATIC TECHNIQUES INSERM SYMPOSIUM No. 2, FELDMAN ET AL. EDITORES, NORTH-HOLLAND PUBLISHING Co. AMSTERDAM PÁG.7 (1976).
44. REED, C.E.: ALLERGIC MECHANISMS IN EXTRINSIC ALLERGIC ALVEOLITIS. PROGRESS IN IMMUNOLOGY 4:271, (1974).
45. REED, C.E., SOSMAN, A.J., BARBEE, R.A.: PIGEON BREEDER'S LUNG: A NEWLY OBSERVED INTERSTITIAL PULMONARY DISEASE. J.A.M.A. 193:261, (1965).
46. REYES, P.A., SANDOVAL, J., DÍAZ, V.: NEUMONITIS POR HIPERSENSIBILIDAD A PALOMAS, (I), VALOR CLÍNICO DE LA CONTRAINMUNOELECTROFORESIS (CIE) PARA DETECTAR ANTICUERPO ESPECÍFICO EN SUERO. ARCH. INST. CARDIOL. MEX. 51:97, (1981).
47. ROBERTS, R.C., MOORE, V.L.: IMMUNOPATHOGENESIS OF HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS. AM. REV. RESP.

Dis. 116:1075, (1977).

48. ROITT, I.M. ESSENTIAL IMMUNOLOGY, 4A. EDICIÓN. BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS. OXFORD/LONDON/EDINBURGH/BOSTON/MELBOURNE PÁG. 217 (1980).
49. RYTEL, M.W.: COUNTERIMMUNOELECTROPHORESIS IN DIAGNOSIS OF INFECTIOUS DISEASE. HOSPITAL PRACTICE 10:75, (1975).
50. SALVAGGIO, J.E.: HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS: PANDORA'S BOX. N: ENGL. J. MED. 283:314, (1970).
51. SCHLUETER, D.P.: RESPONSE OF THE LUNG TO INHALED ANTIGENS. AM. J. MED. 57:476, (1974).
52. SHATZ, M., PATTERSON, R., FINK, J.N.: IMMUNOPATHOGENESIS OF HYPERSENSITIVITY PNEUMONITIS. J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL. 60:27, (1977).
53. SOSMAN, A.J., BARBORIAK, J.J., REED, C.E.: IMMUNOLOGIC INVESTIGATION OF PIGEON BREEDER'S DISEASE. ALLERGY 36:210, (1965).
54. VAN OSS, C.J., BARTHOLOMEW, W.B.: PRECIPITATION REACTIONS, CAP. 6 EN ROSE, N.R., BIGAZZI, PLE. EDITORES. METHODS IN IMMUNODIAGNOSIS. 2A. EDICIÓN. JOHN WILEY AND SONS. NEW YORK/CHICHESTER/BRISBANE/TORONTO PÁG. 65 (1980).
55. VAN WEEMEN, B.K., SCHUURS, A.H.W.M.: IMMUNOASSAY USING ANTIGEN-ENZYME CONJUGATES. FEBS LETTERS 15:232, (1971).

56. VERNON, L., MOORE, V.L., FINK, J.N.: IMMUNOLOGIC EVENTS IN PIGEON BREEDER'S DISEASES. J. ALLERGY CLIN. IMMUNOL. 53:319, (1974).
57. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.: THE APPLICATION OF MICROPLATE ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAYS TO SOME INFECTIOUS DISEASES. FIRST INTERNATIONAL SYMPOSIUM ON IMMUNOENZYMATIC TECHNIQUES, INSERM SYMPOSIUM No. 2. FELDMAN ET AL. EDITORES, NORTH-HOLLAND PUBLISHING CO., AMSTERDAM PÁG. 167 (1976).
58. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.: ENZYME IMMUNOASSAYS IN DIAGNOSTIC MEDICINE. BULL. WORLD HEALTH ORGAN. 53:55, (1976).
59. VOLLER, A., BIDWELL, D.E., BARTLETT, A.: ENZYME-LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY, CAP. 45 EN ROSE, N.R., FRIEDMAN, H. EDITORES. MANUAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY, 2A. EDICIÓN. AMERICAN SOCIETY FOR MICROBIOLOGY. WASHINGTON, D.C. PÁG.359 (1980).
60. VOLLER, A., BARTLETT, A., BIDWELL, D.E.: IMMUNOASSAYS OF THE 80'S. INTERNATIONAL MEDICAL PUBLISHERS. FALCON HOUSE, LANCASTER, ENGLAND (1981).
61. VON PIRQUET, C.: MÜNCH. MED. WOCHENSCHR. 30:1457, 1906, EN GELL, P.G.H., COOMBS, R.R.A., LACHMANN, P.J., EDITORES, CLINICAL ASPECTS OF IMMUNOLOGY, 3A. EDICIÓN. BLACKWELL SCIENTIFIC PUBLICATIONS, OXFORD/LONDON/EDINBURGH/MELBOURNE PÁG. 1723 (1975).