

11220  
2ej<sup>o</sup> 3

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO



Facultad de Medicina  
División de Estudios de Postgrado  
Hospital de Especialidades "Centro Médico Nacional"  
Servicio de Inmunología Clínica y Alergia

Técnicas de Valoración Inmunológica, Análisis  
de Costos y Principales Indicaciones Clínicas en  
el Laboratorio de Inmunología.

T E S I S

para sustentar el título de  
Especialista en Inmunología Clínica y Alergia  
p r e s e n t a

Dra. Alicia María Dolores González Espinosa



México, D. F.

HOSP. DE ESPECIALIDADES  
DEL C. M. N.  
31 889  
TESIS CON  
FALLA DE CUMPLIMIENTO  
INVESTIGACION



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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

	Página
- Resumen	1
- Introducción	2
- Objetivos	5
1) <i>Análisis de Costos de Siete Técnicas de Laboratorio para la Valoración del Estado Inmunológico :</i>	7
* Antecedentes	7
* Material y Método	13
* Resultados	15
* Conclusiones	18
* Cuadro # 1 .	19
2) <i>Descripción General de las Técnicas :</i>	20
* <i>Inmunoglobulinas y Factores del Complemento por Nefelometría ( IgG, IgM, IgA, C<sub>3c</sub> y C<sub>4</sub> ) .</i>	20
* <i>Inmunoglobulina E Total ( PRIST ) .</i>	24
* <i>Rosetas T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub> con Anticuerpos Monoclonales .</i>	28
* <i>Reducción del Nitroazul de Tetrazolio ( NTB ) : Fagocitosis en Reposo y Activada .</i>	31
* <i>Degranulación de Basófilos por la Técnica de Shelley modificada .</i>	35
* <i>Factor Inhibidor de la Migración a Penicilina (MIF) .</i>	37
* <i>Inmunoglobulina E Específica ( RAST ) .</i>	39

## INDICE

	<i>Página</i>
<i>III) Principales Indicaciones Clínicas para los Estudios Inmunológicos Analizados :</i>	<i>42</i>
- <i>Comentario</i>	<i>46</i>
- <i>Bibliografía</i>	<i>48</i>

RESUMEN :

El presente es un estudio retrospectivo, observacional, transversal, descriptivo, el cual fue elaborado para investigar el análisis de costos de siete técnicas de laboratorio para la valoración inmunológica de pacientes manejados en el Servicio de Inmunología Clínica y Alergia del HE CMN del IMSS, durante el periodo comprendido entre enero y diciembre de 1988, obteniéndose los costos por muestra y anual de cada técnica y la suma de éstos en el año; Así mismo se hace una descripción general de las técnicas y un análisis de las principales indicaciones clínicas de los estudios inmunológicos analizados, encontrando que en este análisis de costos, la prueba de laboratorio más económica fue la Degranulación de Basófilos con un costo de \$ 8,486.49 le sigue la Determinación de IgE Total con un costo de \$ 11,705.94 , posteriormente la Fagocitosis (NTB) con un costo de \$ 15,084.70 , la Determinación de Factor Inhibidor de la Migración con un costo de \$ 15,412.37 , la Determinación de IgE Específica (RAST) con un costo por alérgeno específico de \$ 25,492.66 , la Determinación de Rosetas completa ( T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub> ) con un costo de \$ 36,417.64, la Determinación de Inmunoglobulinas y Factores del Complemento (IgG, IgM, IgA, C<sub>3</sub> y C<sub>4</sub>) con un costo de \$ 72,756.11 por paciente con las cinco determinaciones. Costos tales que al multiplicarse por la producción anual de cada técnica y la suma de todas las técnicas, nos resultó en un costo total anual de \$ 72'591,628.00 . Dichos costos fueron utilizados por un método que está basado y calculado estrictamente en las reglas contables, siendo un estudio estimativo con una confiabilidad del ± 20% de los resultados obtenidos .

## INTRODUCCION :

Con frecuencia el médico intenta evaluar de un modo general la función inmune, tratando de demostrar su indemnidad funcional o la presencia de alguna alteración específica que le sea de utilidad en el diagnóstico, pronóstico o seguimiento de algunos pacientes. La gran variabilidad biológica de la población, sumada a limitaciones propias de los procedimientos utilizados, hace que generalmente los resultados obtenidos sean de valor para la interpretación de fenómenos fisiológicos o patológicos, pero de limitada aplicación a casos individuales. Las múltiples publicaciones que demuestran inequívocamente alteraciones inmunitarias en algunos grupos de patologías han inducido a los clínicos principalmente en países tecnológicamente desarrollados, donde se dispone con facilidad de pruebas inmunológicas, a malutilizar estos estudios de laboratorio, elevando enormemente los costos de salud sin obtener a cambio una mejora significativa en la calidad diagnóstica o terapéutica. Así es evidente que muchos procedimientos inmunológicos están siendo aplicados en forma prematura e inapropiada, antes de que hayan madurado suficientemente.

En el mes de mayo de 1981, la Organización Mundial de la Salud propició una Reunión de expertos con la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS-WHO), la que concluyó que los estudios inmunológicos de aplicación clínica, son frecuentemente sobreutilizados. El informe de la Comisión estableció que las pruebas inmunológicas, tienen indicaciones más bien modestas y deberían reservarse especial

mente para la evaluación de las inmunodeficiencias o de las enfermedades en las cuales se ha demostrado que existen alteraciones en las inmunoglobulinas o el complemento o en aquellas en las que se espera la aparición de autoanticuerpos. Esto es así para la medicina en general y es igualmente cierto en lo que se refiere a la patología del tracto respiratorio en donde, aunque existe la promesa cierta de que las nuevas técnicas inmunológicas revolucionarán en breve nuestra manera de pensar, de evaluar y de tratar a los enfermos, en el momento actual la mayoría no han demostrado aún una correlación satisfactoria con la clínica que permita su aplicación indiscriminada para el manejo práctico de todos los pacientes, un ejemplo que muestra la Comisión es la medición de IgE total, la cual no es necesaria salvo para casos muy infrecuentes y que la determinación de IgE específica no es esencial en ninguna circunstancia, el empleo de rutina de linfocitos B y T así como la inducción de blastogénesis con mitógenos son de aplicación clínica limitada, los métodos de análisis de inmunocomplejos se estimó como no esencial, solo útil para algunas entidades específicas igualmente las determinaciones de las fracciones del complemento, solo tienen aplicación clínica limitada. Analizando especialmente los niveles de células B y T y sus subpoblaciones principales  $OKT_1$ ,  $OKT_4$ ,  $OKT_8$ , tanto locales como en sangre periférica, formando toda clase de rosetas, parece tener un inherente rango de variabilidad biológica, tan amplio que desafían una interpretación útil en los casos en los que teóricamente deberían ser de utilidad. Por otra parte el significado funcional de estas subpoblaciones han ido variando al apreciarse por ejemplo que los linfocitos  $OKT_8$  que se denominaron supresores

(  $T_s$  ) no son tan específicos, ya que tienen también funciones ci totóxicas y que hay además de ellos, otras células del sistema monocito / macrófago con funciones supresoras, aparte de numerosos inhibidores humorales del tipo monoquinas y linfoquinas con importante actividad supresora. Otras consideraciones parecidas se postulan para los llamados linfocitos T inductores / ayudadores (  $T_h$  ) representados por la subpoblación  $OKT_8$ .

El aumento logarítmico de la publicación de nuevas técnicas inmunológicas, parece haber inducido a los no especialistas a suponer que cualquier materia que ocupe tanto espacio en la literatura médica debe ser relevante en alguna medida para la práctica médica clínica. Es importante en este sentido el progreso de la investigación básica como la que evalúa la aplicación a la clínica de los avances tecnológicos, pero resaltar que las técnicas inmunológicas de utilidad para el manejo práctico de los enfermos son relativamente escasas y que la mayoría de ellas no están listas para salir del ámbito de los laboratorios de investigación, siendo su incorporación prematura a los laboratorios clínicos generales, una manifestación de desmesurado optimismo en cuanto a su utilidad, teniendo éstas por su sofisticada tecnología un costo que no va en relación directa con el beneficio.



## OBJETIVOS :

1) Determinar los costos de siete técnicas de laboratorio para la valoración del estado inmunológico de pacientes manejados en el Servicio de Inmunología Clínica y Alergia del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional ( IMSS ), durante el periodo comprendido entre enero y diciembre de 1988 .

- a) Costo por muestra de cada técnica,
- b) Costo anual de cada técnica.
- c) Costo total de las siete técnicas durante 1988.

Siendo analizadas las Técnicas siguientes :

1) Determinación de Seroproteínas Humanas en la Nefelometría :

- Inmunoglobulinas ( IgG, IgM, IgA )
- Factores del Complemento ( C<sub>3c</sub> y C<sub>4</sub> )

2) Determinación de la Prueba Radioinmunoabsorbente en Papel ( PRIST ) :

- Inmunoglobulina E ( IgE )

3) Determinación de Antígenos de Superficie ( T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub> ) en Linfocitos Humanos con Anticuerpos Monoclonales Específicos :

- Rosetas ( T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub> )

4) *Determinación por Prueba de Reducción del Colorante Nitroazul de Tetrazolio ( NTB ) :*

- *Fagocitosis en Reposo y Activada*

5) *Determinación de la Degranulación de Basófilos por la Técnica de Shelley modificada :*

- *Degranulación de Basófilos*

6) *Determinación del Factor Inhibidor de la Migración a Penicilina ( MIF ) :*

- *Factor Inhibidor de la Migración a Penicilina (MIF)*

7) *Determinación de Anticuerpos IgE Específicos con la Técnica Enzimática por Radioalergoadsorbencia ( RAST ) :*

- *RAST a alérgenos específicos*

8) *Descripción General de las Técnicas de Laboratorio.*

9) *Principales Indicaciones Clínicas de los Estudios Inmunológicos Analizados.*

31 " ANALISIS DE COSTOS DE SIETE TECNICAS DE LABORATORIO PARA

LA VALORACION DEL ESTADO INMUNOLOGICO "

3) " ANÁLISIS DE COSTOS DE SIETE TÉCNICAS DE LABORATORIO PARA  
LA VALORACION DEL ESTADO INMUNOLOGICO "

ANTECEDENTES :

*El costo de los estudios de laboratorio es generalmente ignorado por el médico, utilizando dicho recurso como una arma importante de ayuda diagnóstica sin tomar en cuenta el costo real de cada uno de ellos.*

*Para hablar de costos tenemos que iniciar por el concepto de COSTO, que en un plano general es " El conjunto de pagos, obligaciones contraídas, consumos, depreciaciones, amortizaciones y aplicaciones atribuibles a un periodo determinado, relacionadas con las funciones de producción, distribución, administración y financiamiento .*

*Los costos de producción están formados por tres elementos fundamentales : 1) La materia prima empleada en la producción. 2) La mano de obra o trabajo humano utilizado en la transformación de aquélla. 3) Un conjunto de erogaciones, consumos, depreciaciones, amortizaciones y aplicaciones de activos fijos, cargos diferidos y gastos pagados por adelantado de carácter fabril .*

*Los costos de distribución, administración y financiamiento, a su vez se clasifican de acuerdo con el tipo de actividad a que se refieren :*

*1) Costos de distribución que comprenden todas las erogaciones, depreciaciones, amortizaciones y aplicaciones correspondientes al alma-*

cenamiento, empaque, despacho y entrega de los productos terminados, los gastos de promoción, publicidad y propaganda y los gastos del departamento de ventas y de su personal. 2) Costos de administración, que abarcan todas las erogaciones, depreciaciones, amortizaciones y aplicaciones relacionadas con la dirección y manejo de las operaciones generales de la empresa, incluidas la gerencia, tesorería, controlarla, contabilidad, auditoría, crédito y cobranzas, caja y oficinas generales. 3) Costos financieros, que incluyen las erogaciones, y aplicaciones de erogaciones previas relacionadas con la obtención de recursos ajenos que la empresa necesita para su desenvolvimiento, con los que debe cubrir determinadas prestaciones, tales como intereses sobre préstamos, sobre emisión de obligaciones etc...

En este estudio se realiza un análisis de costos de producción únicamente, ya que los estudios realizados son de utilidad estrictamente institucional, no estando sometidos a ganancias para el Instituto, ya que se utilizan para beneficio de asegurados y beneficiarios del ISS, no teniendo que pagar en forma extra dichos estudios, sino solo la cuota previamente establecida por la Ley .

### Los Elementos del Costo de Producción :

#### a) Materias Primas :

Representan el punto de partida de la actividad manufacturera, por constituir los bienes sujetos a transformación. Los materiales previamente adquiridos y almacenados se convierten en costos en el momento que salen del almacén hacia la fábrica para utilizarse en dos for

mas diferentes : Identificando y relacionando el material usado con el producto o grupo de productos en que se emplee, Material Directo o sin establecer la identificación o correlación entre los materiales usados y el producto o grupo de productos que se elaboren, Materiales Indirectos .

b) Mano de Obra :

Representa el factor humano que interviene en la producción sin el cual por mecanizada que pudiera estar una industria, sería imposible realizar la transformación. El factor determinante de esta actividad es incuestionablemente el elemento humano, desde el director de la fábrica por su atención a los problemas más importantes que se presentan o a cuyo surgimiento se anticipa, hasta el más modesto mozo, que ejecuta las tareas rutinarias del aseo, todos ellos de acuerdo con la estructura propia de la organización de que se trate, son necesarios para la industria, los cuales se subdividen en dos grupos principales : 1) El que trabaja dentro de la planta industrial misma en la fabricación propiamente dicho y 2) El que se desenvuelve dentro del área de la organización administrativa y de ventas; En este estudio nos dedicaremos al primer núcleo de personas principalmente .

Por lo que " Mano de Obra " constituye el conjunto de sueldos, salarios y prestaciones devengados por los empleados encargados de dicha producción, clasificándose la mano de obra en Directa e Indirecta . Tomando la mano de obra Directa a aquél personal encargado de la producción estrictamente hablando, y como mano de obra Indirecta al personal que colabora en forma secundaria, pero no interviene en la

producción propiamente dicho, y que su costo se incluye en los Cargos Indirectos .

c) Diversas Erogaciones, Consumos, Depreciaciones, Amortizaciones y Aplicaciones Fabriles :

Este tercer elemento del costo de producción, constituye por su complejidad uno de los temas medulares de este trabajo, siendo uno de los puntos más complejos se manejará con el nombre de Cargos Indirectos, los cuales se clasifican genericamente en seis grupos principales :

- 1) Materias Primas Indirectas Utilizadas.
- 2) Mano de Obra Indirecta Empleada.
- 3) Erogaciones Indirectas de Fabricación.
- 4) Depreciaciones de Activos Fijos Fabriles.
- 5) Amortizaciones de Cargos Diferidos Fabriles.
- 6) Aplicaciones de Gastos Fabriles Pagados por Anticipado.

Las cuales se desglosan de la siguiente forma :

1) Materias Primas Indirectas Utilizadas :

- Materia prima que se devuelve por alguna razón y no se utiliza.

2) Mano de Obra Indirecta Empleada :

- Incluye los sueldos y prestaciones de altos funcionarios, jefes de departamento, empleados administrativos, prestaciones especiales a los empleados, incapacidades, vacaciones y trabajos extras .

### 3) Erogaciones Indirectas de Fabricación :

- Incluye renta, alumbrado, fuerza, calefacción, erogaciones de -troqueles, erogaciones de herramientas, conservación y mantenimiento, reparaciones exteriores, diversas erogaciones fabriles .

### 4) Depreciaciones de Activos Fijos y Fabriles :

- Del edificio, de la maquinaria y equipo, del equipo de transporte interno, del mobiliario y equipo de las oficinas, de los troqueles.

### 5) Amortizaciones de Cargos Diferidos Fabriles :

- Se refieren a gastos de instalación de la fábrica, gastos de adaptación fabriles .

### 6) Aplicación de Gastos Fabriles Pagados por Anticipado :

- Incluye el consumo de útiles de escritorio y papelería dentro de la fábrica, aplicación de impuesto predial o de la renta pagada por anticipado, aplicación de las primas de seguro contra incendio del edificio , maquinaria y equipo fabril, aplicación de las primas de seguro contra incendio de las materias primas, aplicación de las primas de seguro contra accidentes de los trabajadores etc...

### El Costo Primo y el Costo de Producción

La suma de los elementos directos que intervienen en la elaboración de los artículos : Materia Prima ( directa exclusivamente ), Mano - de Obra ( directa exclusivamente ), y en algunas industrias espe -



*ciales ciertos conceptos adicionales directos, distintos de la materia prima y la mano de obra, a los que se les denomina " Otros Costos Directos ", ejem : Impuestos directos sobre la producción, forman el costo primo o costo primario del que puede decirse que el conjunto de costos incurridos identificables con la elaboración de los productos .*

*El Costo Total de la Producción se forma por la suma de elementos directos e indirectos de carácter fabril, que mediante asignaciones directas a los productos ( elementos directos ) o derramas más o menos complejas y laboriosas de los indirectos, cuya técnica integran el costo de producción de los artículos .*

*Bibliografía : 7, 18, 21 .*

## M A T E R I A L Y M E T O D O S :

El presente estudio fue elaborado para investigar los costos de siete técnicas de laboratorio para la valoración del estado inmunológico de pacientes manejados en el Servicio de Inmunología Clínica y Alergia del Hospital de Especialidades del Centro Médico Nacional IMSS, durante el periodo comprendido entre enero y diciembre de 1988, analizándose las técnicas siguientes: 1) Determinación de seroproteínas humanas en la nefelometría, 2) Determinación de la prueba radioinmunoabsorbente en papel (PRIST), 3) Determinación de antígenos de superficie T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub>, en linfocitos humanos con anticuerpos monoclonales específicos, 4) Determinación por prueba de reducción del colorante nitroazul de tetrazolio (NTB), 5) Determinación de la Degranulación de basófilos por la técnica de Shelley modificada, 6) Determinación del factor inhibidor de la migración a penicilina (MIF), 7) Determinación de anticuerpos IgE específicos con la técnica enzimática por radioalergoabsorbencia (RAST), obteniendo los costos de estas técnicas como: - Costo por muestra de cada técnica, - Costo anual de cada técnica, - Costo total de las siete técnicas durante el año de 1988. Diseñándose el presente estudio como: Estudio observacional, retrospectivo, transversal, descriptivo, denominado aproximado como Encuesta Descriptiva.

La captación de la información se llevó a cabo, tomando en cuenta los siguientes puntos: 1) Productividad, 2) Material Utilizado.

Entendiendo como productividad el número de muestras procesadas primeramente mensualmente y después durante el periodo comprendido entre -

enero y diciembre de 1988, se obtuvo el número de muestras de los informes mensuales de enero a diciembre de 1988, del archivo del Servicio de Inmunología Clínica y Alergia.

El material utilizado de enero a diciembre de 1988, comprendiéndose - éste como : - Gastos Directos, - Mano de Obra, - Gastos Indirectos, ya desglosados en los antecedentes, se obtuvieron de los pedidos mensuales, pedidos especiales, Instructivos y visualización directa de las técnicas en el propio laboratorio de Inmunología Clínica y Alergia ubicado en el Banco de Sangre del IMSS, Almacén General del HE CMN, Jefatura de Inventarios del HE CMN, Jefaturas Administrativas del HGZ # 1 Gabriel Mancera ( ya que los gastos indirectos son compartidos con dicho hospital ) y de la Delegación 3 Sureste ( ya que hay gastos indirectos que se pagan directamente por esta delegación, aplicándoseles un costo a cada lugar ) .

El método para calcular los costos de las siete técnicas antes mencionadas se obtuvieron sacando el costo primero de los gastos directos - de cada técnica, posteriormente la mano de obra y finalmente los gastos indirectos para cada una de las técnicas, por muestra, calculando posteriormente el número de muestras procesadas al año de cada una de las técnicas y por último la cuenta del costo total de las siete técnicas en el año de 1988.

Este método está basado y calculado estrictamente de los registros contables, siendo un estudio estimativo con una confiabilidad de ± 20 %

en los resultados obtenidos .

Cabe aclarar que en cuanto a parte del mobiliario del laboratorio, al calcularse la depreciación del mismo no se obtuvo ningún valor para poder ser aplicado (1.00); Así como , dentro de los gastos indirectos concernientes al agua y al predio no fueron tomados en cuenta por no poder conseguir dichas cifras. Para calcular los gastos indirectos - con el número de muestras procesadas en proporción directa con el número de pacientes estudiados, se realizaron los siguientes ajustes : Cuando se determinan las Inmunoglobulinas y los Factores del Complemento con excepción del IgE, cada muestra se procesa para los cinco reactivos ( IgG, IgM, IgA, C<sub>3c</sub> y C<sub>4</sub> ) por lo que se sacó el costo pa-  
ra los cinco reactivos tomándose para cálculos de gastos indirectos la cantidad de 623 muestras. En cuanto a la determinación de Linfocitos T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub>, también cada muestra se procesa generalmente para los cuatro reactivos por lo que se tomaron como muestras de referencia - 67, con estos ajustes y los totales anuales de las otras técnicas seña-  
ladas en el cuadro número 1, da una cantidad de 2875 muestras rea-  
les para el cálculo de los gastos indirectos. Los costos incluyen el - 3% del pacto a partir de septiembre y , el 15% de IVA del material comprado en esas condiciones.

### RESULTADOS :

La productividad de muestras procesadas durante 1988 se encuentra des-  
glosada en el Cuadro número 1 .

### 1 ) DETERMINACION DE SEROPROTEINAS HUMANAS EN LA NEFELOMETRIA

A cada muestra se le determinaron las cinco seroproteínas humanas , con excepción de algunas muestras por lo que se sacó un promedio general obteniéndose 616 muestras anuales con cinco determinaciones ( IgG, IgM, IgA, C<sub>3c</sub> y C<sub>4</sub> ) con los siguientes costos :

- Costo por muestra	:	\$	72,756.64
- Costo anual de 616 muestras	:	\$	44'818,090.00

### 2 ) DETERMINACION DE LA PRUEBA RADIOINMUNOABSORBENTE EN PAPEL

#### IgE ( PRST )

Se obtuvo una producción anual de 801 muestras anuales con un costo siguiente :

- Costo por muestra	:	\$	11,705.94
- Costo anual de 801 muestras	:	\$	9'376,457.90

### 3 ) DETERMINACION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE ( T<sub>1</sub>, B, T<sub>2</sub>, T<sub>8</sub> ) EN LINFOCITOS HUMANOS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECIFICOS

#### ( ROSETAS )

- Costo por muestra	:	\$	36,417.67
- Costo anual de 67 muestras	:	\$	2'439,983.80

4 | DETERMINACION POR PRUEBA DE REDUCCION DEL COLORANTE NITRO-  
AZUL DE TETRAZOLIO ( NTB ) FAGOCITOSIS

Se obtuvo una producción anual de 46 muestras para fagocitosis en re  
poso y activada con los siguientes resultados :

- Costo por muestra	:	\$	15,084.70
- Costo anual de 46 muestras	:	\$	693,896.20

5 | DETERMINACION DE LA DEGRANULACION DE BASOFILOS POR LA  
TECNICA DE SHELLEY MODIFICADA

Se obtuvo una producción anual de 1040 degranulaciones de basófilos  
a diversos medicamentos con los siguientes resultados :

- Costo por muestra	:	\$	8,486.49
- Costo anual de 1040 muestras	:	\$	8'825,949.60

6 | DETERMINACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACION A LA  
PENICILINA ( MIF )

Se obtuvo una producción anual de 115 estudios con los siguientes re  
sultados :

- Costo por muestra	:	\$	15,412.37
- Costo anual de 115 muestras	:	\$	1'772,422.50

7 | DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgE ESPECIFICOS CON LA TECNICA ENZIMATICA POR RADIOALERGOABSORBENCIA ( RAST )

Se obtuvo una producción anual de 183 determinaciones de IgE específica a diversos alérgenos con el siguiente costo :

- Costo por muestra por disco	:	\$	25,492.66
- Costo anual de 183 muestras	:	\$	4'665,156.70

Por lo que la producción anual durante el periodo de enero a diciembre de 1988, el costo total de las muestras procesadas en el Laboratorio de Inmunología Clínica y Alergia del HE CMN, IMSS, fue de : \$ 72'591,628.00 para las siete técnicas de laboratorio en este trabajo investigadas .

C O N C L U S I O N E S :

Del presente análisis se concluye que la prueba más económica es la Degranulación de Basófilos ( \$ 8,486.49 ), IgE Total ( \$ 11,705.94 ), Fagocitosis (NTB) ( \$ 15,084.70 ), MIF ( \$ 15,412.37 ), IgE Específica (RAST) por disco de alérgeno ( \$ 25,492.66 ), Rosetas completas ( \$ 36,417.64 ), Inmunoglobulinas y Factores del Complemento, las cinco determinaciones ( \$ 72,756.11 ). El Costo Total Anual fue de ( \$ 72'591,628.00 ) de todas las muestras de las siete técnicas analizadas, en el periodo comprendido de enero a diciembre de 1988 .

" INFORME ANUAL "

- 1988 -

MUESTRAS PROCESADAS : 5,532

Cuentos # 1.

M E S	JgG	JgA	JpA	C3c	C4	JgE	D	T	T4/T8	FAGOS	D.O.	MJF	RAST
ENERO	16	16	16	16	16	16	-	-	-	2	59	-	-
FEBRERO	10	10	10	10	10	8	-	-	-	1	43	3	-
MARZO	32	32	34	32	32	43	-	-	-	-	35	6	-
ABRIL	40	40	40	40	40	40	-	-	-	-	60	40	-
MAYO	45	45	46	33	33	48	-	-	-	2	42	9	6
JUNIO	40	40	40	40	40	47	-	-	-	-	36	10	15
JULIO	50	50	50	50	50	55	12	12	12/12	1	58	5	58
AGOSTO	56	56	56	56	56	64	6	6	6/6	3	229	15	42
SEPTIEMBRE	59	59	59	59	59	68	6	6	6/6	3	162	11	3
OCTUBRE	91	91	91	91	91	102	6	6	6/6	3	125	5	-
NOVIEMBRE	94	94	94	94	94	165	14	14	14/14	6	143	7	12
DICIEMBRE	87	87	87	87	87	145	23	23	23/23	25	53	4	46
<b>TOTAL</b>	<b>620</b>	<b>620</b>	<b>623</b>	<b>608</b>	<b>608</b>	<b>801</b>	<b>67</b>	<b>67</b>	<b>67/67</b>	<b>46</b>	<b>1040</b>	<b>115</b>	<b>183</b>

TOTAL GLOBAL : 5,532 muestras.



391 " DESCRIPCION GENERAL DE LAS TECNICAS "

## 3) " DESCRIPCION GENERAL DE LAS TECNICAS "

### 1) DETERMINACION DE SEROPROTEINAS HUMANAS EN LA NEFELOMETRIA

- Inmunoglobulinas ( IgG, IgM, IgA )
- Factores del Complemento ( C<sub>3c</sub>, C<sub>4</sub> )

#### DESCRIPCION DE LA TECNICA :

Las inmunoglobulinas y factores del complemento son proteínas contenidas en el suero humano; Cuando se someten a reacción inmunológica con anticuerpos específicos, forman inmunocomplejos . Las concentraciones existentes pueden ser determinadas cuantitativamente mediante la medición de la difusión luminosa, evaluándose mediante una curva estándar trazada con la ayuda de diluciones del estándar .

- 1) Toma de sangre venosa 10 ml .
- 2) Incubar durante las dos primeras horas a temperatura ambiente, en tubo de ensayo de vidrio de 13 x 100 .
- 3) Remover el coágulo con un aplicador de madera .
- 4) Centrifugar la muestra durante 30 min a 3000 rpm (centrífuga con cabeza de 13 cm de radio) .
- 5) Separar el suero y centrifugar 30 min a 3000 rpm .
- 6) Separar el suero y congelarlo en tubo de ensayo de plástico 12 x 75 ( dos por paciente ) ó bien se monta la técnica .

### 7) DILUCION DEL SUERO :

- Se hace una dilución 1:101 para IgG, IgM, IgA y C<sub>3c</sub>, con 1 de suero por 100 de solución salina al 0.9% .

( 10 ul de suero + 1000 ó 1 ml de solución salina al 0.9% )

- Se hace una dilución 1:21 para C<sub>4</sub>, con 1 de suero por 20 de solución salina al 0.9% . .

( 10 ul de suero + 200 ul de solución salina al 0.9% )

### 8) DILUCION DEL ANTISUERO :

- Se hace una dilución de 1:5 para IgG, IgA, C<sub>3c</sub> y C<sub>4</sub>, con 1 del antisuero específico por 4 de solución salina al 0.9% .

( 50 ul de antisuero específico + 200 ul de solución salina al 0.9% )

Esto se hace con cada uno de los antisueros específicos por paciente .

- Se hace una dilución de 1: 3.5 para IgM, con 1 de antisuero específico por 2.5 de solución salina al 0.9% .

( 50 ul de antisuero específico IgM + 125 ul de solución salina al 0.9% ) . Esto se hace con antisuero IgM por paciente .

9) En los tubos de ensaye de vidrio 13 x 100 marcados con las letras G, M, A, C<sub>3c</sub> y C<sub>4</sub> se les añade los antisueros específicos ya diluidos en cantidad proporcional al número de pacientes. ( ver inciso 8 ) .

10) En los tubos de ensaye de vidrio 12 x 75 para dilución del suero marcados con los números 1, ( 2, 3, 4 etc...) se coloca la dilución del suero 1:101 ( inciso 7 ) utilizando un tubo por paciente. Y en

los tubos de ensaye de vidrio 12 x 75 para la dilución del suero marcados con :  $C_1$  (  $C_2$  ,  $C_3$  ,  $C_4$  etc... ) se coloca la dilución del suero 1:21 ( inciso 7 ) utilizando un tubo por paciente .

Y a los dos tubos marcados con números por ejemplo 11 y 12 que correspondían a los tubos control se les añaden 10 ul de Suero N Estándar de Proteína Humana ( control ) , así como a los marcados por ejemplo  $C_{11}$  y  $C_{12}$  se les añade el mismo suero control en la misma cantidad ( 10 ul ) .

#### 11) PREPARACION DE LAS CELDILLAS DEL NEFELOMETRO :

- Se utilizan celdillas para Nefelómetro de plástico las cuales se ordenan en cinco filas para IgG, IgM, IgA,  $C_3c$  y  $C_4$  , poniendo el número de celdillas necesario de acuerdo al número de pacientes ( se utilizan cinco celdillas por paciente ) .
- Las celdillas se introducen vacías al Nefelómetro para determinar su lectura, introduciéndose por fila ejem: primero la fila de IgG de izquierda a derecha y posteriormente con las restantes en el mismo orden .
- A cada celdilla de Nefelómetro se agrega 200 ul del Antisuero Específico ejemplo: 200 ul de Antisuero IgG a cada celdilla de la fila IgG de izquierda a derecha y así para cada celdilla de cada una de las filas en el orden de la lectura previa, con excepción de IgM en que se agregan 140 ul por celdilla de la fila IgM .
- Se toma de los tubos de ensaye de vidrio de 12 x 75 que contienen el suero diluido incluyendo los sueros control como sigue :

\* 10 ul de suero a cada celdilla de Nefelómetro con Antisuero IgG (°) , (°): celdilla correspondiente al paciente .

- 200  $\mu$ l de suero a cada celdilla de Nefelómetro con Antisuero IgM (°).
- 100  $\mu$ l de suero a cada celdilla de Nefelómetro con Antisuero IgA (°).
- 100  $\mu$ l de suero a cada celdilla de Nefelómetro con Antisuero C<sub>3</sub>c (°).
- 100  $\mu$ l de suero a cada celdilla de Nefelómetro con Antisuero C<sub>4</sub> (°).
- Después de añadido el suero se dejan incubando por 30 a 40 minutos a temperatura ambiente .

12) Se lleva a cabo la lectura de las celdillas por filas y en el mismo orden que al inicio de la primera lectura en Nefelómetro ( Behring Laser-Nephelometer ) .

13) Los resultados pasan en forma automática del Nefelómetro a una computadora ( Hewlett Packard 9815 A con cassette programado, comparándose los resultados con una curva estándar ) .

Bibliografía : 4, 8, 22, 25 .

11) DETERMINACION DE LA PRUEBA RADIOINMUNOABSORBENTE EN PAPEL( P R I S T )

- Inmunoglobulina E ( IgE )

DESCRIPCION DE LA TECNICA :

La determinación cuantitativa de la prueba radioinmunoabsorbente en papel es una prueba de inmunoensayo enzimático en la fase sólida - basada en la técnica del sandwich :

- Anti IgE covalentemente acoplada a un disco de papel, reacciona con los anticuerpos IgE en el complejo durante la primera incubación a temperatura ambiente, permaneciendo el complejo Anti IgE-IgE después del lavado .
- Anti IgE conjugada con la enzima  $\beta$ -galactosidasa reacciona con la IgE del complejo durante la segunda incubación a temperatura ambiente, lavando y retirando el sobrenadante para dejar únicamente el complejo enzimático Anti IgE-IgE-Anti IgE .
- La enzima es liberada por los agentes reducidos, glutatión y reacciona con el sustrato, o-nitrofenil- $\beta$ -galactosa, durante la tercera incubación a 37°C . La reacción es frenada por la adición de carbonato de sodio. La absorbencia del color amarillo formado es medida y es directamente proporcional a la concentración de Anticuerpos IgE de la muestra. La lectura se hace con un Colortmetro a 420 nm y se compara con una curva estándar .

1) Toma de sangre venosa 5 ml .

- 2) Incubar durante las dos primeras horas a temperatura ambiente , en tubo de ensaye de vidrio de 13 x 100 .
- 3) Remover el coágulo con aplicador de madera .
- 4) Centrifugar la muestra durante 30 minutos a 3000 rpm ( centrifuga con cabeza de 13 cm de radio ) .
- 5) Separar el suero y centrifugar nuevamente durante 30 min a 3000 rpm.
- 6) Separar el suero y congelarlo en dos tubos de ensaye de plástico de 12 x 75 ó bien se monta la técnica .
- 7) Añadir un disco de Anti IgE en el fondo del tubo en la siguiente forma :
  - Limpiar con papel absorbente los discos para retirar la humedad sobrante.
  - Tomar los discos con unas pinzas secas .
  - Evitar la evaporación del buffer manteniendo la caja de los discos tapada mientras no se utiliza .
  - Al agregar las substancias siguientes, depositarlas sobre el centro del disco sin tocar las paredes del tubo .
- 8) Añadir 100 ul de suero estándar dentro de los discos en los tubos estándar ejem: 1 al 14 a diferentes diluciones .
- 9) Las muestras se preparan diluyendo el suero o plasma 10 ó 11 veces con el diluyente de muestras ejem: 50 ul de suero + 500 ul ó 450 ul de diluyente. Si los valores sobrepasan 800 KU/L, pueden realizarse otras diluciones, pero si están por debajo de 10 KU/L, se debe manejar sin diluir el suero .
- 10) Añadir 100 ul del suero en estudio sobre el disco que se encuentra den

tro del tubo correspondiente a los pacientes .

- 11) Cubrir todos los tubos con parafilm .
- 12) Incubar en reposo durante 3 horas ó bien agitarse 1 hora a temperatura ambiente .
- 13) Añadir 2.5 ml de Solución Lavadora a todos los tubos, retirando todo el líquido de cada tubo utilizando pipetas Pasteur o un aspirador múltiple, ( el golpear los discos con la pipeta no altera los resultados ), repetir dicho lavado en dos ocasiones más, retirando completamente la solución lavadora antes de pasar al siguiente punto .
- 14) Añadir 100 ul de Enzima Anti-IgE dentro de los discos en todos los tubos .
- 15) Cubrir todos los tubos con parafilm .
- 16) Incubar en reposo durante toda la noche o bien agitarlos durante dos horas a temperatura ambiente.
- 17) Añadir 2.5 ml de solución lavadora a todos los tubos de la misma forma que en el inciso 13 .
- 18) Añadir 200 ul de Solución Desarrolladora dentro de los discos en todos los tubos y en dos tubos adicionales denominados como tubos Blanco.
- 19) Cubrir todos los tubos con parafilm .
- 20) Incubar exactamente 60 minutos a  $36^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  ó 2.5 horas de 20 a  $25^{\circ}\text{C}$ .
- 21) Añadir 1000 ul de Solución Frenadora dentro de todos los tubos incluyendo los Blanco, en el mismo orden en que se añadió la Solución Desarrolladora, siendo muy importante mezclarlas bien .



- 22) Medir la absorbencia en Colorímetro a 420 nm, utilizando los tubos Blanco para calibrar en cero .
- 23) El cálculo de los resultados se hace, realizando primero una curva estándar con los resultados obtenidos de las muestras con sueros estándar a diferentes diluciones y ya sobre esta curva estándar se colocan los resultados obtenidos de las muestras de los sueros problema, obteniéndose la concentración de la IgE en KU/l directamente de la curva estándar, multiplicando los resultados por el factor de dilución utilizado .

Bibliografía : 2, 8, 13, 14, 19, 24 .

377 | DETERMINACION DE ANTIGENOS DE SUPERFICIE ( T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub> )  
EN LINFOCITOS HUMANOS CON ANTICUERPOS MONOCLONALES ESPECIFICOS

- Rosetas ( T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub> )

DESCRIPCION DE LA TECNICA :

Este método está encaminado a la determinación de marcadores o antígenos de superficie celular para linfocitos T, B, T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub>, por un método en el que se utilizan anticuerpos monoclonales específicos para dichos antígenos, con la formación subsecuente de Rosetas ( Inmuno esferas en la fase sólida ). Los resultados se obtienen en porcentaje, dividiendo el número de cada tipo de linfocitos por el total de linfocitos contados y se multiplican por cien, obteniendo así el porcentaje de cada uno .

- 1) Toma de sangre venosa 10 ml con jeringa con 1 ml de heparina de 1000 U/ml .
- 2) Hacer una dilución 1:1 ( sangre : solución salina o diluyente de rosetas ) en un tubo de rosca estéril .
- 3) Se toman 6 ml de sangre previamente diluida y se agregan 3 ml de Ficoll-Hypaque estéril y se deja durante 20 minutos a temperatura ambiente .
- 4) Centrifugar durante 20 minutos a 1800 rpm .
- 5) Separar con una pipeta Pasteur la interfase celular que se encuentra:  
 1ra. = plasma, 2da. = INTERFASE, 3ra. = Ficoll-Hypaque, 4ta. = eritrocitos .

- 6) Agregar Buffer Salino Fosfato o Diluyente de Rosetas cuanto baste para 10 ml.
- 7) Centrifugar durante 10 minutos a 1800 rpm ( en centrifuga con cabeza de 13 cm de radio ).
- 8) Decantar completamente el diluyente de Rosetas, dejando unicamente las células en el fondo y agregar 10 ml más de diluyente de rosetas, mezclándolos perfectamente.
- 9) Dividir los 10 ml en dos tubos de ensaye ( 5 ml para determinar células T y B y los otros 5 ml para determinar subpoblaciones  $T_4$  y  $T_8$  ) Etiquetando los tubos como T/B y  $T_4/T_8$ .
- 10) El tubo marcado con T/B se incuba durante 30 min en Baño María a  $37^\circ\text{C}$ , mientras el tubo marcado con  $T_4/T_8$  se queda en espera.
- 11) Se le agrega a los tubos T/B y  $T_4/T_8$ , 5 ml de diluyente y se centrifuga por 5 min a 950 rpm.
- 12) Se decantan y se agregan 5 ml de diluyente, centrifugándolos durante 5 min a 950 rpm, decantándolos nuevamente.
- 13) Se añade a cada tubo 400 ul de Buffer Fosfato o Diluyente.
- 14) En pipeta de Thoma se ponen células hasta la marca .5 y se agrega Azul de Tolpano hasta llegar a la marca 1.1 de dicha pipeta ( Se utiliza una pipeta por cada tubo ).
- 15) Las pipetas se agitan en el agitador de pipetas durante 1 minuto y se procede a ajustar las células a  $3.5 \times 10^6$ , colocando una gota en la cámara de Neubauer, leyéndose en el microscopio de luz con el objetivo 25 X, buscando solo linfocitos. Y se hacen los ajustes necesarios con diluyente.
- 16) Se etiquetan tubos de ensaye de plástico por duplicado :  
T/B, T/B,  $T_4/T_8$ ,  $T_4/T_8$  por paciente.

- 17) A cada tubo se le añade 100  $\mu$ l de células ajustadas a  $3.5 \times 10^6$ , con pipeta de 100  $\mu$ l.
- 18) Se añaden 100  $\mu$ l de Microesferas con Anticuerpo Monoclonal Específico T, B (\*) a los tubos marcados con T/B.
- 19) Se añaden 100  $\mu$ l de Microesferas con Anticuerpo Monoclonal Específico T<sub>4</sub>, T<sub>8</sub> (\*) a los tubos marcados T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub>.
- 20) Se agitan suavemente durante unos segundos y se colocan los tubos: T/B, T/B, T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub>, T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> + sus respectivos Anticuerpos Monoclonales en la centrífuga durante 4 minutos a 950 rpm.
- 21) Se sacan de la centrífuga y se les coloca un tapón de plástico colocándose en el Baño María durante 30 min a 37°C.
- 22) Se sacan del Baño María y se introducen al refrigerador por un mínimo de 15 minutos.
- 23) Se sacan del refrigerador y se agitan con pipeta de 20  $\mu$ l tomándose 20  $\mu$ l de cada tubo colocándose en un portaobjeto ( un portaobjeto por tubo ) y a la gota previa se le agrega 20  $\mu$ l de Eritrocina B ( colorante vital ), se cubre con un cubreobjetos.
- 24) Se hace la lectura en Microscopio de Luz al objetivo 40 X, leyéndose aproximadamente 200 células de cada uno.

(\*) = Previamente agitados con agitador Vortex durante 10 seg.

Bibliografía : 1, 5, 6, 8, 26.

#### IV ) DETERMINACION POR PRUEBA DE REDUCCION DEL COLORANTE

##### NITROAZUL DE TETRAZOLIO ( NTB )

- Fagocitosis en Reposo y Activada .

#### DESCRIPCION DE LA TECNICA :

El nitroazul de tetrazolio (NTB) es un compuesto hidrosoluble de color amarillo claro que forma formazán. Los neutrófilos pueden reducir el colorante después de la ingestión de látex o de otras partículas, subsiguiente a la explosión de energía generada a través de la derivación de la hexosamonofosfato. El colorante reducido puede medirse con facilidad mediante un fotómetro, después de su extracción de los neutrófilos con el solvente orgánico Piridina. La reducción del NTB, a un color azul intenso, es la base cuantitativa de la prueba del NTB. El mecanismo preciso de la reducción es desconocido pero el fenómeno está relacionado íntimamente con los eventos metabólicos en el estallido respiratorio que sigue a la ingestión, incluyendo el aumento de la actividad de la derivación de la hexosamonofosfato, elevación del consumo de oxígeno y aumento de la formación de peróxido de hidrógeno, así como del radical superóxido. Debido a que la generación de la actividad reductora en los neutrófilos corre paralela con su actividad metabólica después de la ingestión, la reducción del NTB es un medio útil para calcular la intensidad global de los neutrófilos fagocitantes. La incapacidad para reducir el colorante NTB es una anomalía importante diagnóstica en la Enfermedad Granulomatosa Crónica. Los neutrófilos de estos enfermos no -

pueden destruir ciertos microbios intracelulares y son incapaces de generar  $H_2O_2$  o el radical superóxido.

- 1) Se toma sangre venosa 20 ml en jeringa con 1 ml de heparina de 1000 U/ml.
- 2) Se incuba en estufa bacteriológica a  $37^\circ C$  durante 1 hora para sedimentar ( en la misma jeringa hacia arriba ).
- 3) Se separa el plasma y se coloca en un tubo de ensaye de vidrio de 13 x 100, centrifugándose durante 10 minutos a 1800 rpm para obtener el paquete celular y se decanta.
- 4) Se añade cloruro de amonio al 0.83%, 5 ml (  $NH_4Cl$  )
- 5) Se incuba en Baño María durante 10 min a  $37^\circ C$ .
- 6) Se centrifuga durante 10 min a 1800 rpm y se decanta el cloruro de amonio al 0.83%.
- 7) Agregar Buffer Krebs 2.5 ml y centrifugar durante 5 min a 1800 rpm y decantar.
- 8) Ajustar células a  $2.5 \times 10^6$ , utilizando una pipeta de Thoma a la cual se le colocan hasta la marca .5 de células y hasta 1.1 de azul de tripano. Se colocan en el agitador de pipetas durante 1 minuto, y se coloca 1 gota en la Cámara de Neubauer y se lee en microscopio de luz al objetivo 25 X, añadiéndose buffer Krebs para ajustarlas.
- 9) Por otra parte en 5 tubos de ensaye de vidrio 15 x 150 para llevar a cabo la reacción, se etiquetan con las siguientes letras:  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $B_1$ . ( A = activada, R = reposo, B = blanco ) y se les añaden .35 ml, .35 ml, .40 ml, .40 ml, .40 ml respectivamente de buffer Krebs.

- 10) A cada tubo de le añade .4 ml de Nitroazul de Tetrazolio al 0.2% ,  
( previamente disuelto en solución salina ).
- 11) Agregar a cada tubo .1 ml de cianuro de potasio al 0.01 molar .
- 12) Posteriormente agregar .05 ml de latex en partículas al  $0.84 \times 10^6$   
a los tubos marcados como  $A_1$ ,  $A_2$  y meter a incubar en Baño María  
a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 minutos ( antes de agregar las células ) .
- 13) De las células ya ajustadas se toma .1 ml y se depositan en cada  
uno de los tubos ( 5 ) .
- 14) Se agrega ácido clorhídrico de .5N unicamente al tubo  $B_1$  la canti-  
dad de 10 ml y se incuba a  $37^\circ\text{C}$  durante 15 min.
- 15) Se agrega ácido clorhídrico de .5N a los tubos restantes  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $R_1$ ,  
 $R_2$  la cantidad de 10 ml .
- 16) Centrifugar los 5 tubos en centrifuga refrigerada durante 15 min a -  
2800 rpm, se decantan y se agitan manualmente .
- 17) Se añaden 3 ml de Piridina a todos los tubos y se hierven durante  
15 minutos en Baño María .
- 18) Se toman otros 5 tubos de ensaye de vidrio de 13 x 100 y se marcan  
con :  $A_1$ ,  $A_2$ ,  $R_1$ ,  $R_2$ ,  $B_1$  .
- 19) Se pasa el contenido a los nuevos frascos y se centrifugan en centri  
fuga fría durante 15 min a 2800 rpm y se extrae el contenido de és-  
tos con pipeta Pasteur dejando las impurezas adheridas a las paredes  
y en el fondo colocando el contenido en otros tubos igualmente marca-  
dos .
- 20) Se leen los tubos en Fotocolorímetro a 615 nm, con celdillas para fo-  
tocolorímetro, una para el tubo blanco y la otra para los tubos pro-  
blema, ajustando en ( cero ) con el  $B_1$  .

LECTURA DE LAS MUESTRAS :

El fotocolorímetro se ajusta en ( 0% ) en la línea de porcentaje del aparato con el tubo conteniendo la substancia blanco ( B<sub>1</sub> ) posteriormente se introduce un tubo problema y nuevamente se calibra con el tubo blanco ( utilizando el tubo blanco de cada paciente en forma individual ) Los resultados se obtienen en porcentaje .

Bibliografía : 2, 8, 24, 27 .



V ) DETERMINACION DE LA DEGRANULACION DE BASOFILOS POR LA  
TECNICA DE SHELLEY MODIFICADA

- Degranulación de Basófilos .

DESCRIPCION DE LA TECNICA :

La degranulación de basófilos fue introducida por Shelley en 1962 y ha sido principalmente utilizado para el diagnóstico de la Esquistosomiasis así como para la Hipersensibilidad a medicamentos, alérgenos ambientales y alimentos . Esta prueba ha sufrido diversas modificaciones y una de las importantes fue en 1977 en la cual se observó - por medio de dos grupos de investigadores la propiedad que tienen - los basófilos de teñirse con el colorante azul de toluidina cuando se encuentran íntegros, propiedad que pierde después de haberse degranulado, la técnica aquí descrita tiene la modificación del empleo del buffer Tris y un Ph de 7.6 obteniéndose los resultados en porcentaje .

- 1) Toma de sangre venosa 15 ml con 1 ml de heparina de 1000 U/ml .
- 2) Se incuba en estufa bacteriológica a 37°C durante 1 hora para sedimentar ( en la misma jeringa con la punta hacia arriba ) .
- 3) Se extrae el plasma completo en un tubo de ensaye de vidrio de 13 x 100 .
- 4) Centrifugar en centrifuga fría a 4°C durante 10 min a 1000 rpm - ( centrifuga con cabeza de 14 cm de radio )
- 5) Decantar y agregar buffer Tris .5 ml para el tubo problema y .5ml

para el tubo control .

- 6) Poner 0.1 ml del medicamento (\*), antígeno o alimento en un tubo de ensaye .
- 7) Poner 0.1 ml de solución salina al 0.9% en el tubo de ensaye control o si se trata de alimentos 0.1 ml de Solución de Evans .
- 8) Incubar en baño maría a 37°C durante 30 minutos .
- 9) Sacar y tomar 50 ul de rojo neutro al 0.2% filtrado, a cada tubo y agitar manualmente .
- 10) Incubar a temperatura ambiente durante 10 minutos .
- 11) Poner 10 ul de células en un portaobjetos ( por duplicado ) el contenido de ambos tubos, el problema y el control.
- 12) Dejar secar a temperatura ambiente .
- 13) Fijar con calor .
- 14) Teñir con azul de toulidina .
- 15) Se cuentan 1000 células con microscopio de luz y se saca el porcentaje de basófilos degranulados, tomando el número de basófilos del control como el 100% .

( \* ) = Los medicamentos se preparan a una dilución de 1:2000 con solución salina y buffer Tris .

**Bibliografía** : 8, 10, 11, 17 .

VII DETERMINACION DEL FACTOR INHIBIDOR DE LA MIGRACION A  
PENICILINA ( M J F )

- Factor Inhibidor de la Migración a Penicilina ( M J F ) .

DESCRIPCION DE LA TECNICA :

La técnica realizada en el laboratorio está basada en el método para la preparación del antígeno de Haimovich y col y para la inhibición de la migración por el método modificado por Wolfson y col , modificadas por el Dr Zamacona y col . El factor inhibidor de la migración, es una linfocina que inhibe la migración de los macrófagos, inducida por un antígeno específico, siendo esta propiedad un fenómeno directamente relacionado con la hipersensibilidad a un antígeno de terminación, predominantemente de tipo celular siendo también un reflejo de la hipersensibilidad humoral .

- 1) Toma de sangre venosa 20 ml en jeringa con 1 ml de heparina de 1000 U/ml .
- 2) Incubar en estufa bacteriológica a 37°C durante 1 hr. ( en la misma jeringa pero inclinada con la punta hacia arriba ) .
- 3) Se saca de la estufa y se deja la jeringa en posición vertical durante 5 minutos .
- 4) Desechar las primeras gotas y coleccionar el sobrenadante en un tubo de ensayo de vidrio estéril .
- 5) Centrifugar durante 10 min a 1000 rpm .
- 6) Decantar y al sedimento agregar 5 ml de cloruro de amonio al 0.83% .

- 7) Incubar en estufa bacteriológica durante 5 min a 37 °C .
- 8) Centrifugar durante 10 min a 1500 rpm y en caso necesario repetir los puntos 6, 7, y 8 .
- 9) Lavar dos a tres veces con Hank's Heparinizado 5U/ml .
- 10) Resuspender las células en medio de cultivo ( RPM ) con 10 a 15 % de Suero Fetal Bobino .
- 11) Contar las células y ajustarlas a  $30 \times 10^6$  por ml .
- 12) Llenar los capilares previamente desengrasados con la suspensión y sellarlos con plastilina de un lado .
- 13) Meter a centrifugar en tubos de centrifuga estériles durante 2 minutos a 450 rpm .
- 14) Se cuentan los capilares hasta donde se encuentra el paquete de células sobre el papel filtro .
- 15) Se preparan las Cámaras de Albom con cubreobjetos de un lado, pegando con una mezcla de parafina-cera ( 2:3 ) y sellarlo .
- 16) Agregar solución estéril en la base e incrustar los capilares en silicona .
- 17) Colocar el otro cubreobjeto y sellar con parafina-cera ( 2:3 ) .
- 18) Se procede a llenar las cámaras con medio de cultivo y con suero fetal bobino más el antígeno a diferentes concentraciones, realizando un control sin antígeno .
- 19) Sellar los orificios con parafina-cera y colocar en caja de Petri estéril con gasa .
- 20) Incubar en estufa bacteriológica a 37°C durante 24 horas.
- 21) La zona de migración se proyecta y se copia sobre un papel cebolla , se recorta y se pesa en una balanza analítica, obteniéndose el resultado en porcentaje tomando como 100 % de migración la muestra control.

*Bibliografía* : 3, 23, 28, 29 .

VII) DETERMINACION DE ANTICUERPOS IgE ESPECIFICOS CON TECNICA ENZIMATICA POR RADIOALERGOABSORBENCIA ( RAST )

- RAST a diversos alergenos .

DESCRIPCION DE LA TECNICA :

Se ha postulado que en las enfermedades alérgicas, uno de los anticuerpos que se elevan entre otros, está la IgE Específica para determinado antígeno. Por el método aquí señalado, el alérgeno se encuentra acoplado en forma covalente a un disco de papel, que va a reaccionar con la IgE Específica del paciente en estudio, posterior al lavado, la Anti-IgE conjugada con la enzima  $\beta$ -galactosidasa, reacciona con la IgE ya ligada con el antígeno, se lleva a cabo otro lavado para dejar el complejo Alérgeno-IgE-Anti IgE. La enzima se incrementa por la sustancia reducida ( glutation ) y reacciona con el sustrato ( o-nitrofenil- $\beta$ -galactosa ) para formar un producto de color amarillo. La hidrólisis enzimática es frenada por la adición de Carbonato de Sodio. La absorbencia se mide a 420 nm y es directamente proporcional a los niveles de Alérgeno-IgE Específica .

- 1) Toma de sangre venosa 5 ml .
- 2) Incubar durante las dos primeras horas a temperatura ambiente, en tubo de ensaye de vidrio de 13 x 100 .
- 3) Remover el coágulo con un aplicador de madera .
- 4) Centrifugar la muestra durante 30 minutos a 3000 rpm . ( centrifuga con cabeza de 13 cm de radio ) .

- 5) Separar el suero y centrifugar 30 minutos a 3000 rpm .
- 6) Separar el suero y congelarlo en dos tubos de ensayo de plástico de 12 x 75 o bien se monta la técnica .
- 7) Añadir un disco de referencia a los tubos 3-10, añadir el disco del alérgeno apropiado del tubo 11 en adelante.
- 8) Pipetear 50 ul de Suero de Referencia ( A al D ) por duplicado dentro de los tubos 3 al 10 ( evitar dispersarlo sobre las paredes del tubo ).
- 9) Pipetear 50 ul de Suero Problema del tubo 11 en adelante .
- 10) Cubrir los tubos con parafilm y dejar incubando durante 3 hrs. a temperatura ambiente .
- 11) Agregar 2.5 ml de Solución Lavadora a todos los tubos con excepción de los tubos 1 y 2 , y dejarlos reposar por 10 minutos. Repetir el - procedimiento de lavado dos veces más. Aspirar completamente sin hacer espuma.
- 12) Pipetear 50 ul de Enzima-Anti IgE en todos los tubos .
- 13) Cubrir todos los tubos con parafilm e Incubar toda la noche ( 16-20 horas ) a temperatura ambiente .
- 14) Lavar tres veces al igual que en el inciso número 11 .
- 15) Pipetear 200 ul de Solución Desarrolladora dentro de los discos en todos los tubos y dentro de dos tubos vacíos adicionales ( blanco ) .
- 16) Cubrir todos los tubos incluyendo los blanco con parafilm e incubar exactamente durante 120 min a  $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$  .
- 17) Pipetear 1000 ul de Solución Frenadora en todos los tubos, incluyendo los blanco, en el mismo orden en que se añadió la solución desarrolladora, es importante mezclarlos bien .
- 18) Se mide la absorbencia del color del producto a 420 nm con un fosmetro, utilizando los tubos blanco para ajustar en cero .

Para calcular los resultados, se calculan los valores de absorbencia promedio de cada suero de referencia y se registran los resultados en una hoja, realizándose una curva de referencia, posteriormente los resultados de la absorbencia de los sueros problema, se registran en la curva de referencia, los resultados se reportan en Unidades (PRU/ml). Las referencias asignadas para los sueros A, B, C y D son 17.5 , 3.5 0.7 , 0.35 . El esquema de absorbencia se obtiene por cada suero - de referencia, frente a los valores de las PRU/ml en papel logarítmico.

*Bibliografía* : 8, 9, 15, 20, 24 .

333 I " PRINCIPALES INDICACIONES CLINICAS PARA LOS ESTUDIOS

INMUNOLOGICOS ANALIZADOS "



III) " PRINCIPALES INDICACIONES CLÍNICAS PARA LOS ESTUDIOS  
INMUNOLÓGICOS ANALIZADOS "

Con la reciente expansión de la Inmunología Clínica, también se han introducido una gran variedad de pruebas diagnósticas inmunológicas y debido al incremento en la demanda de tales procedimientos clínicos su uso ha sido exagerado, por tal motivo se llegó a la necesidad de definir cuales son las indicaciones más apropiadas para la realización de dichas pruebas, obteniendo así un beneficio real en su uso, siendo analizadas estas opciones en mayo de 1981 por la Unión Internacional de Sociedades Inmunológicas y la Organización Mundial de la Salud, en la que analizaron ocho procedimientos inmunológicos, que corresponden a los más frecuentemente utilizados, y que para el objeto de nuestro estudio se encuentran cuatro de ellos y los otros tres restantes no analizados aún por dicha Organización pero sí por otros autores, podemos concluir lo siguiente :

Las Inmunoglobulinas determinadas por nefelometría, se considera que sus indicaciones esenciales son en el estudio de Inmunodeficiencias - primarias y secundarias, Inmunodeficiencia selectiva de IgA, Hipogammaglobulinemia severa que recibe tratamiento con inmunoglobulinas. Se considera útil en las Gamopatías monoclonales idiopáticas benignas por paraproteinemias secundarias a mieloma, determinación de IgM en cordón en infecciones congénitas como tripanosomiasis o esplenomegalia - tropical. Se pueden utilizar para fines de investigación en hipergammaglobulinemias, enfermedades linfoproliferativas, cirrosis hepática ,

*lupus eritematoso sistémico, en familias con inmunodeficiencias o inmunoglobulinas homogéneas para aclarar el papel que juega la información genética entre otras .*

*La detección de inmunoglobulinas en orina nos sirve para detectar la proteína de Bence Jones. El líquido cefalorraquídeo es de gran utilidad para la detección de IgG aumentada en los pacientes con neurocisticercosis, esclerosis múltiple, panencefalitis esclerosante aguda y tripanosomiasis africana .*

*La Inmunoglobulina E es de utilidad relativa, por ser un mediador de la enfermedad atópica aunque no el único, encontrándose incrementada en las enfermedades parasitarias, considerándose esencial unicamente para el síndrome Hiper IgE, asociado con eosinofilia y con infecciones recurrentes descrito por Buckley, se considera útil en enfermedades mediadas por IgE ( rinitis perenne, asma bronquial, dermatitis, urticaria crónica e intolerancia a alimentos, aspergilosis broncopulmonar alérgica, considerándose como marcador pronóstico de enfermedades atópicas en niños . En la actualidad se practica el método de PRIST-ELISA, para determinar IgG4 que podrá tener más o el mismo valor que IgE .*

*La Inmunoglobulina E Específica no es esencial en ninguna situación clínica, no siendo alternativa de una historia clínica cuidadosa y pruebas cutáneas, por lo que las pruebas de medición específica pueden ser útiles en las situaciones siguientes : Dermografismo o dermatitis severa que impiden las pruebas cutáneas , cuando por tratamientos sintomáticos ( antihistamínicos ) no pueden ser suspendidos o cuando las reac-*

ciones de hipersensibilidad son extremadamente peligrosas para el paciente, no pudiéndose aplicar las pruebas cutáneas, en la alergia a alimentos, ya que las pruebas cutáneas son menos confiables. Con fines de investigación la IgE Específica se puede utilizar en enfermedades mediadas por IgE en algunas infecciones parasitarias.

Para la determinación de los factores del complemento, las indicaciones son las siguientes: En la determinación del CH-50 es esencial solo cuando se sospecha de defecto genético, como en pacientes con infecciones recurrentes, especialmente en la meningitis recurrente con angioedema o en enfermedades mediadas por complejos inmunes. La determinación de  $C_1$ -inhibidora de esterasa I es esencial para el angioedema hereditario; Las estimaciones de CH-50,  $C_3$ ,  $C_4$  son de ayuda en el monitoreo de pacientes con glomerulonefritis, en enfermedades mediadas por inmunocomplejos como el lupus eritematoso sistémico, ciertas formas de vasculitis y en condiciones tales como el dengue hemorrágico, pero las pruebas de complemento en forma rutinaria son de poco valor en infecciones o enfermedades inflamatorias agudas o crónicas.

La determinación de células T y B es esencial en las inmunodeficiencias secundarias y en la clasificación de enfermedades linfoproliferativas, - en estudios de investigación se puede utilizar en las enfermedades autoinmunes, en la inmunidad tumoral y en la inmunidad de las enfermedades infecciosas. La determinación de subclases de células T pueden ser de utilidad pero no esenciales en enfermedades autoinmunes, en los síndromes mielodisplásicos, quemaduras, en la enfermedad ingerto contra-huesped, leucemia linfocítica aguda en remisión, recuperación del trans-

plante de médula ósea, SIDA, infecciones por herpes virus, mononucleosis infecciosa, sarampión, artritis reumatoide, diabetes mellitus insulino-dependiente, cirrosis biliar primaria, dermatitis atópica, síndrome de Sézary, psoriasis, hepatitis crónica autoinmune y otras. Es importante aclarar que el hecho de encontrar determinaciones normales de estas células, no garantiza el funcionamiento adecuado de las mismas.

En cuanto a la degranulación de basófilos, no es esencial para ninguna patología, pero sí es de utilidad para determinar la hipersensibilidad a medicamentos, alimentos, parásitos, venenos de insectos, alérgenos ambientales, esquistosomiasis y en la hidatidosis hepática. Pudiendo haber falsos resultados por degranulación inespecífica del basófilo.

El factor inhibidor de la migración, utilizado como ayuda diagnóstica en los casos de hipersensibilidad a medicamentos así como a diversos parásitos, en enfermedades autoinmunes tales como colitis ulcerativa crónica, glomerulonefritis, tiroiditis autoinmune, y síndrome de Sjögren, procesos infecciosos, así como en la inmunología del trasplante y la oncología.

La fagocitosis en sus múltiples métodos para determinar la función de los neutrófilos es esencial en la enfermedad granulomatosa crónica (autosómica recesiva o ligada al sexo) y útil en el síndrome de Job, síndrome de Chédiak-Higashi, deficiencia de mieloperoxidasa, deficiencia glucosa 6 fosfato deshidrogenasa, leucemia aguda, síndrome de Down, lactante prematuro, disfunción transitoria de neutrófilos, infecciones agudas, ataxia-telangiectasia y crioglobulinemia.

Bibliografía : 2, 8, 12, 24, 27 .

## COMENTARIO :

*Después de analizar los costos y las principales indicaciones clínicas de las técnicas de laboratorio previas, podemos concluir que dichas pruebas son de ayuda diagnóstica para diversas enfermedades, siendo solo en raras ocasiones la clave fundamental del diagnóstico de las mismas, no debiéndose utilizar como arma de primera elección, estando como siempre la Historia Clínica detallada como el arma más útil - para el diagnóstico de todas las enfermedades; Asimismo cabe mencionar que las pruebas cutáneas en las enfermedades alérgicas, tienen un papel fundamental de gran utilidad diagnóstica y pauta terapéutica, ya que son más económicas, rápidas y específicas, superando de esta forma a los métodos de laboratorio tales como la determinación de IgE total y específica .*

*El Laboratorio de Inmunología Clínica y Alergia fue donde se comenzaron a practicar todas estas pruebas, llevando la vanguardia, siendo el servicio más completo, dando lugar al nacimiento de 36 Servicios de Alergia distribuidos en toda la República Mexicana y originando asimismo el gran cambio en relación a esta controvertida enfermedad llamada alergia, controvertida en algunos aspectos, más por tradición que por realidad, ya que en la actualidad se conoce en forma amplia que las enfermedades alérgicas tienen una base inmunológica real , - " No pudiendo existir la Alergia sin la Inmunología " .*

*Es cierto que en nuestra especialidad así como en todas las demás ,*

*Hay algunos aspectos en cuestionamiento que quedan aún por resolverse, por eso no estamos de acuerdo con algunas de las críticas que se han hecho hacia los alergólogos que también son inmunólogos las cuales resultan absurdas en la época actual. La rigidez científica deseable, aplicada a la mayor parte de las especialidades médicas, nos demuestra lo mucho que ignoramos, lo lamentable es que algunos inmunólogos estando concientes de sus limitaciones, se sientan expertos en esta interesante parte de la Medicina que aún está en investigación.*

" B I B L I O G R A F I A "

- 1) Baran M., et al.; *J. Immunol. Methods*; 1982; 53: 321 .
- 2) Bellanti J.A.; *Inmunología; Interamericana, México D.F.*, 3ª ed, 1986.
- 3) Bendixen G., Soborg M.; *A leucocyte migration technique for in vitro detection of cellular ( delayed type ) hipersensitivity in man; Dan. Med. Bull.*; 1969; 16 (11): 1-5 .
- 4) Bering; *For the quantitative determination of human serum proteins - in Nephelometry*; 1987, sept; ( instructivo ) .
- 5) Bio-Rad.; *Quantigen T<sub>4</sub>/T<sub>8</sub> cell surface marker assay. For determination of leukocytes possessing the T<sub>4</sub> surface antigen and those possessing the T<sub>8</sub> surface antigen in peripheral blood; Bulletin 4242*; 1984; august ( instructivo ) .
- 6) Bio-Rad.; *Quantigen T & B cell assay. For the determination of the percentage of T cell possessing the T<sub>65</sub> surface antigen, B cells and null cells in peripheral blood; Bulletin 4238*; 1984; june ( instructivo )
- 7) Del Rio G.C. ; *Costos 33*; ECASA, México D.F., 11ª ed., 1982 .
- 8) Fudenberg H.H., Stites D.P., Stobo J.D., Wells J.V.; *Inmunología Básica y Clínica; Manual Moderno, México D.F.*, 5ª ed., 1985 .
- 9) Halpern G.M., Bedossa A., Levy C.; *Comparison between RIA and enzyme IA for the determination of total serum and IgG antibodies; Allergol. Immunopath.*; 1980; 8 (4): 269 .

- 10) Hirsch S.R., Zastaw J.E.; *Basophil degranulation: A new method of observation and its correlation with skin testing*; *J. Allergy. Clin. Immunol.*; 1972; 50 (6): 338-47 .
- 11) Hugie M., et al.; *Human basophil degranulation test in liver hidatidosis*; *Dig. Dis. Sci.*; 1987; 32 (12): 1354-7 .
- 12) *International Union of Immunological Societies and The World Health Organization; Use and abuse of eight widely-used diagnostic procedures in clinical immunology : A WHO Memorandum*; *Bull WHO*; 1981; 59 (5): 717-28 .
- 13) Ishizaka K., Ishizaka T., Honnbrook M.M.; *Physio-chemical properties of human reaginic antibody J.V. Presence of a unique immunoglobulin as a carrier of reaginic activity*; *J. Immunol.*; 1966; 97: 75-85 .
- 14) Kjellman, Johansson, Roth; *Serum IgE Levels in healthy children quantified by a sandwich technique ( PRIST )*; *Clin. Allergy* ; 1976; 6 : 51-9 .
- 15) Lundkvist V.; *Research and development of the RAST technology. Advances in diagnosis of allergy*; *RAST Palm Spring Symposium*; 1975: 85 .
- 16) Mendez R.T., Namihira G.D., Morenos A.A., Sosa M.C.; *El Protocolo de Investigación. Lineamientos para su elaboración y análisis*; Trillas , México D.F., 1ª ed., 1986 .
- 17) Mumcuoglu Y., Wortmann; *Modified basophil degranulation test in diagnosis of bee and wasp sting allergies*; *Allergy* ; 1980; 35: 335-40 .

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA



- 18) Ortega A., Perez de León; *Contabilidad de Costos*; UTEHA, México D.F., 4ª ed., 1982 .
- 19) Pharmacia Diagnostics ; Phadezim IgE PRIST 60, enzyme immuno assay; 1983 ; november ( instructivo ) .
- 20) Pharmacia Diagnostics ; Phadezym RAST 60, enzyme immuno assay; 1986; abril ( instructivo ) .
- 21) Reyes Perez E.; *Contabilidad de Costos*; Limusa, México D.F., 2ª ed ., 1980 .
- 22) Rowe D.S., Anderson S.G., Grab B.; *A research standard for human serum immunoglobulins IgG, IgA and IgM* ; Bull WHO; 1970; 42: 535 .
- 23) Soborg M., Bendixen G.; *Human lymphocyte migration as a parameter of hypersensitivity*; Acta Med Scand ; 1967; 181 (2) : 247-56 .
- 24) Thompson R.A.; *Techniques in Clinical Immunology*; Blacwell Scientific Publications, London 1ª ed., 1977 .
- 25) Vanes L., et al.; *International collaborative study of four candidate reference preparations for the antigenic and hemolytic measurement of human serum complement components*; J. Biol. Stand; 1981; 9: 91-104 .
- 26) Werblen B.J., Debell K., Valeri C.R.; *New Engl. J. Med.*; 1983; 309 - (13): 793 .
- 27) William Rojas M.; *Inmunología*; Fondo Educativo Interamericano, Colombia, 5ª ed., 1983 .

- 28) Wolfson R. L., Maddison S. E., Migration inhibition of peripheral leucocytes in human with schistosomiasis ; *J. Immunology*; 1972; 109 (1): - 123-8 .
- 29) Zamacona R. G., Garamilla S. C., Ortiz O. L.; Un nuevo método para determinar la alergia a penicilina. La inhibición de la migración de leucocitos periféricos de pacientes alérgicos al antibiótico; *Rev. Med. del IMSS*; 1974; 13 (2): 121-7 .