



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA
ESPECIAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

VICTOR ROBERTO LEON PEREA

ASESORES: DR. VICTOR MANUEL ZENDEJAS BUITRON

QFB LADISLAO PALOMAR MORALES

CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

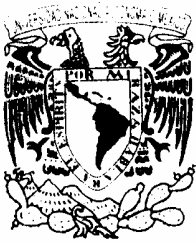
DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis 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.

AGRADECIMIENTOS.

Le doy gracias y se las dedico a mi Padre eterno Dios y a mi Madre maravillosa la Virgen María por haberme ayudado a elaborar y terminar mi tesis y por todo lo que me han dado. Estoy eternamente agradecido con mis Padres que me ayudaron en mi formación como profesionista se las dedico a mi Máma Luz María y a mi Pápa Víctor Manuel junto con mí hermana Luz Ivette que siempre han estado conmigo, me han dado fortaleza para seguir adelante. Este trabajo de tesis se los dedico a mí director de tesis Dr. Víctor Manuel Zendejas Buitrón y a mí Co asesor QFB Ladislao Palomar Morales por estar siempre conmigo y ayudarme a elaborar esta tesis, otro agradecimiento dedicado al Dr. Salvador Fonseca Coronado por su gran ayuda y colaboración en la elaboración de este trabajo de tesis le doy gracias por su formidable participación. Nuevamente se las dedico a los profesores de matemáticas que son mis amigos me ayudaron en los momentos que los necesite son el Prof. Ing José Luz Hernández Castillo y al Prof. Ing José Juan Contreras Espinosa, Prof Francisco Javier Rojas Espinosa finalmente a mis amigos que siempre estuvieron en las buenas y en las malas conmigo son Juan Jesús, Silverio, Ricardo Ordaz, Felipe, Ricardo Jaramillo, Javier, Oscar Garza, José Antonio, Carlos, Miguel Ángel, Raúl, Catalina, Karla Medina, Carla Paulin, Araceli Zepeda, Alejandro, Luis, Leonel, mis amigos del CCH-Naucalpan a Francisco, Juan, Alberto, Angel, Jesús, Sonia, Jorge y a Otros amigos Fernando, Israel, Prof Jorge Luis Mayer, Prof Juan Antonio Montaras Crespo, a las Profras María Esther Revuelta Miranda y María Eugenia Posada Galarza.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES

U. N. A. M.
ASUNTO: **VOTOS APROBATORIOS**
SUPERIORES CUAUTITLAN



DEPARTAMENTO DE
EXAMENES PROFESIONALES

AT'N: Q. Ma. del Carmen García Mares
Jefa del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 19 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Manual de Prácticas de Inmunología Especial

que presenta el pasante: Víctor Roberto León Perea
con número de cuenta: 9507372-5 para obtener el TITULO de:
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicha tesis reúne los requisitos necesarios para ser discutida en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO

ATENTAMENTE.

"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"

Cuautitlán Izcalli, Edo. de Méx., a 30 de mayo de 2006

PRESIDENTE	QFB. Martha Patricia Campos Peón	
VOCAL	QFB. Juan Chiu Chan	
SECRETARIO	Dr. Víctor M. Zendejas Buitrón	
PRIMER SUPLENTE	Dr. Andrés Romero Rojas	
SEGUNDO SUPLENTE	MFC. Beatriz de Jesús Maya Monroy	

ÍNDICE GENERAL.

Lista de Abreviaturas	II
Índice de Figuras	III
Índice de Cuadros	VI
Prefacio	VII
Justificación	IX
Objetivos	X
Práctica N° 1 Seguridad en el Laboratorio	1
Práctica N° 2 Conteo de leucocitos y cuenta diferencial	18
Práctica N° 3 Fagocitosis	26
Práctica N° 4 Reacciones de aglutinación y floculación	35
Práctica N° 5 Precipitación de Inmunoglobulinas	42
Práctica N°6 Cuantificación de proteínas	48
Práctica N° 7 Doble difusión	52
Práctica N° 8 Anatomía del Sistema Inmunitario	58
Práctica N° 9 ELISA	70
Práctica N° 10 Electroforesis e Inmunolectrotransferencia	80
Práctica N° 11 Citometría de flujo	94
Conclusiones	101
Anexo de Preparación de Reactivos	102

LISTA DE ABREVIATURAS.

A	Anteojos de seguridad.
Ac	Anticuerpo.
Ag	Antígeno.
Ag-Ac	Complejo antígeno-anticuerpo.
ASO	Antiestreptolisina-O.
C	Anteojos de seguridad, guantes y mandil.
C'	Factor de complemento.
CANUTEC	Departamento de transporte del Canadá.
CEB	Anteojos de seguridad, guantes y respirador para polvos.
CMF	Citometría de flujo.
D	Careta, guantes y mandil.
DOT	Departamento de transporte de E.U.A.
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético.
EPP	Equipo de protección personal.
ELISA	(enzyme-linked-immuno-sorbent-assay) Inmuno ensayo enzimático.
FR	Factor reumatoide.
HMIS	Siglas en ingles de sistema de identificación de materiales peligrosos.
IFN	Interferón.
Ig	Inmunoglobulina.
Labeled Ab	Anticuerpos marcados.
LT	Linfocito.
MBL	(mannose binding lectin) Lectina enlazada de manosa.
NFPA	Agencia nacional de protección del fuego, de los E.U.A.
NK	(natural killer) Célula asesina natural.
NOM	Norma oficial mexicana.
NPCA	Asociación nacional de productores de pinturas y recubrimientos.
ONU	Organización de naciones unidas.
PCR	Proteína C reactiva.
PBS	Solución amortiguadora de fosfatos.
RPMI	(Roswell Park Memorial Institute) Medio de cultivo desarrollado en MEM medio especial mínimo.
SIH	Sistema inmunitario humano.
SSA	Secretaria de salubridad y asistencia.
SSAF	Solución salina amortiguadora de fosfatos.
SSF	Solución salina fisiológica.
TNF β	Linfotoxina, LT.
TNF α	Factor necrosante tumoral α .
Unlabelled Ab	Anticuerpos sin marca.
VDRL	Laboratorio para investigaciones sobre enfermedades venéreas.
VHb	Virus de hepatitis b.
VIH	Virus de la inmunodeficiencia humana.

ÍNDICE DE FIGURAS.

Figura 1.	Diagrama de flujo de medidas de seguridad	1.
Figura 2.	Símbolos de la NFPA Y HMIS	2.
Figura 3	ONU Sistema de identificación para el transporte de materiales peligrosos	3.
Figura 4.	Esquema del Laboratorio L-511 de FES-C UNAM campo 1	4.
Figura 5.	Microorganismos que pudieran estar presentes en las muestras biológicas	6.
Figura 6.	Diagrama de los residuos biológicos	10.
Figura 7.	Cartel de indicaciones en caso de incendio	15.
Figura 8.	Esquema de los accidentes	16.
Figura 9.	Cámara de Neubauer	18.
Figura 10.	Diagrama de flujo del conteo de leucocitos y la cuenta diferencial	19.
Figura 11.	Extensión de un frotis sanguíneo	21.
Figura 12.	Imágenes de los diferentes tipos de leucocitos en la sangre	22.
Figura 13.	Cascada del proceso fagocítico	26.
Figura 14.	Proceso de fagocitosis	27.
Figura 15.	Diagrama de flujo de fagocitosis	29.
Figura 16.	Efecto de la opsonización en la fagocitosis	32.
Figura 17.	Aglutinación en látex	35.
Figura 18.	Inhibición de la hemólisis	36.
Figura 19.	Diagrama de flujo de pruebas de aglutinación y floculación	37.
Figura 20.	Placa con diluciones de eritrocitos para la prueba de Antiestreptolisinas-O	38.
Figura 21.	Esquema de aglutinación en látex	40.
Figura 22.	Esquema de floculación	40.
Figura 23.	Técnica de desalación	42.
Figura 24.	Gráfica que indica la separación de una proteína en su punto isoelectrico	43.
Figura 25.	Diagrama de flujo de precipitación de inmunoglobulinas	44.
Figura 26	Esquema de diálisis de inmunoglobulinas	46.
Figura 27.	Reacción de Lowry	49.
Figura 28.	Diagrama de flujo de la cuantificación de Lowry	49.
Figura 29.	Imagen de las soluciones que forman la curva patrón	50.
Figura 30.	Esquema de doble difusión	52.
Figura 31	Diagrama de flujo de doble difusión	53.

Figura 32.	Esquema de un antisuero utilizando diluciones dobles	54.
Figura 33.	Esquema de interpretación de las líneas de precipitación	55.
Figura 34.	Esquema del resultado de bandas de precipitación	56.
Figura 35.	Imagen real en donde se observa la precipitación en la doble difusión	56.
Figura 36.	Esquema del sistema inmunitario humano	58.
Figura 37.	Esquema del timo	59.
Figura 38 A.	La médula ósea	59.
Figura 38 B.	Las células sanguíneas	59.
Figura 39 A.	Extracción del bazo	60.
Figura 39 B.	Corte transversal del bazo	60.
Figura 40 A.	El sistema ganglionar linfático	61.
Figura 40 B.	Esquema del ganglio linfático	61.
Figura 41 A.	Placas de Peyer	61.
Figura 41 B.	Corte transversal de las placas de Peyer	61.
Figura 42.	El proceso inflamatorio	62.
Figura 43.	Gráfica del orden de migración de los leucocitos	63.
Figura 44 A.	Esquema del hígado	63.
Figura 44 B.	Biopsia de lesiones alternativas	63.
Figura 45.	Biopsia de necrosis en puente	64.
Figura 46.	Diagrama de flujo de la anatomía del sistema inmunitario	65.
Figura 47.	Irrigación de la sangre en la disección accidental en el ratón	67.
Figura 48 A.	ELISA de amplificación de actividad	71.
Figura 48 B.	ELISA de modulación de competitiva	71.
Figura 49 A.	ELISA de modulación con Ag marcado	72.
Figura 49 B.	ELISA de modulación con Ac marcado	72.
Figura 49 C.	ELISA de modulación con Ac anti-Ig marcado para detectar Ac anti-Ag	72.
Figura 50.	ELISA sistema avidina-biotina	73.
Figura 51.	Sistema ELISA con proteína A	73.
Figura 52.	Sistema ELISA con proteína A inmovilizada	74.
Figura 53.	ELISA de captura	74.
Figura 54.	Diagrama de flujo de ELISA	75.
Figura 55.	Resultado de la prueba de ELISA para sarampión	77.
Figura 56.	Resultado de la prueba de ELISA para hepatitis C	78.

Figura 57.	Tinción con azul de Coomassie de geles SDS-PADE	82.
Figura 58.	Bandas de precipitación en papel de nitrocelulosa	83.
Figura 59.	Diagrama de flujo de electroforesis e inmunoelectrotransferencia	85.
Figura 60	Bandas de antígeno proteínico en una electroforesis	88.
Figura 61.	Bandas de precipitación Ag-Ac patrón	90.
Figura 62.	Separación electroforetica de las bandas del antígeno proteínico en el gel	92.
Figura 63.	Revelado de las bandas del complejo Ag-Ac por transferencia e inmunodetección	93.
Figura 64.	Esquema general de las características que se pueden medir por CMF	94.
Figura 65	Imagen del haz de luz láser	95.
Figura 66.	Doble tinción con anticuerpos monoclonales	97.
Figura 67.	Poblaciones de células de sangre periferica que se pueden observar en una gráfica de granularidad contra tamaño en el citómetro de flujo	98.
Figura 68.	Histogramas generados a partir de la región de linfocitos de la gráfica de tamaño contra granularidad en la que se observan las poblaciones positivas al marcaje con anticuerpos específicos contra los marcadores de fenotipos A) CD4+ y B) CD8+	98
Figura 69.	Gráfica de identificación de fases del ciclo celular que muestra la amplitud de señal (FL2-W) contra el contenido de DNA (FL2-Area) en el citómetro de flujo	99.
Figura 70.	Histograma generado a partir de celulas de la linea linfocítica Raji teñidas con yoduro de propidio que muestra las fases del ciclo celular y el porcentaje de celulas en estado apoptótico (MI)	100.

ÍNDICE DE CUADROS.

Cuadro 1.	Comparación de las áreas de almacenamiento de diferentes sistemas	3.
Cuadro 2.	Clasificación de agentes peligrosos en base al grupo de riesgo	7.
Cuadro 3.	Niveles de bioseguridad en el laboratorio	8.
Cuadro 4.	Clasificación de los agentes patógenos	9.
Cuadro 5.	Medidas de prevención y de contención para accidentes con residuos biológicos	11.
Cuadro 6.	Tipos de recolección de residuos biológicos	11.
Cuadro 7.	Los diferentes tipos de empaque de residuos biológicos	12.
Cuadro 8.	Medidas de primeros auxilios	14.
Cuadro 9.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 2	23.
Cuadro 10.	Conteo de leucocitos	24.
Cuadro 11.	Cuenta diferencial de los leucocitos	24.
Cuadro 12.	Tabla de valores absolutos	24.
Cuadro 13.	Deficiencias de la fagocitosis	28.
Cuadro 14.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 3	33.
Cuadro 15.	Tabla de células fagocitarías y reductoras del NBT	34.
Cuadro 16.	Diluciones de ASO	38.
Cuadro 17.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 4	41.
Cuadro 18.	Reporte de los resultados de pruebas de aglutinación y floculación	41.
Cuadro 19.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 5	47.
Cuadro 20.	Curva patrón para cuantificación de proteínas	50.
Cuadro 21.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 6	51.
Cuadro 22.	Resultados de la cuantificación de proteínas	51.
Cuadro 23.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 7	55.
Cuadro 24.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 8	68.
Cuadro 25.	Resultados del conteo celular del timo	68.
Cuadro 26.	Resultados del conteo celular del bazo	68.
Cuadro 27.	Resultados del conteo celular de las placas de Peyer	68.
Cuadro 28.	Resultados del conteo celular de la muestra de sangre	68.
Cuadro 29.	Tabla de resultados de pruebas de ELISAS de sarampión y hepatitis C	79.
Cuadro 30.	Riesgo de los reactivos de la práctica No 10	91.

PREFACIO.

La intención de este manual es que los alumnos apliquen los conocimientos adquiridos en la asignatura de Inmunología Especial en el Laboratorio de la Asignatura, ya que al poner en práctica su aprendizaje asimilen y aprendan el funcionamiento del Sistema Inmunitario Humano (SIH) e incluso, es indispensable que el mismo alumno, lo ponga en práctica para un diagnóstico oportuno. Se dará una explicación general breve del SIH.

Nuestro entorno contiene una enorme variedad de agentes infecciosos (virus, bacterias, hongos y parásitos). Todos ellos pueden provocar enfermedades graves y si se multiplican sin control, pueden conducir a la muerte del ser humano. La mayoría de las infecciones que contraen los individuos normales son de corta duración y apenas dejan secuelas, esto se debe a la acción del SIH, que combate a dichos agentes infecciosos.

El SIH es el encargado de mantener la homeostasia del organismo. el cual está integrado por defensas externas, como son la piel, los líquidos corporales y las secreciones, el epitelio de las mucosas; Defensas internas, que comprenden órganos específicos del sistema inmunitario, que a su vez producen células de defensa, como son los leucocitos, encargadas de combatir a los microorganismos mencionados anteriormente, con la producción de moléculas llamadas citocinas e inmunoglobulinas.

DEFENSAS EXTERNAS.

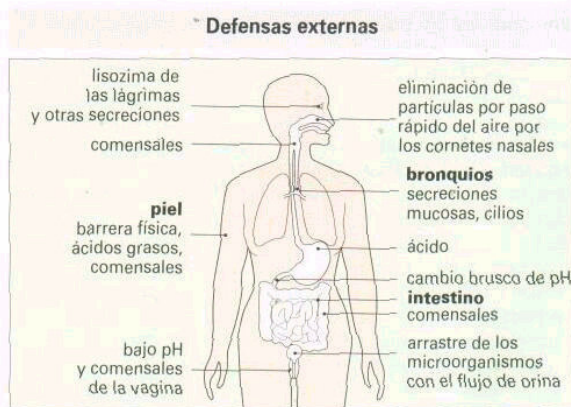
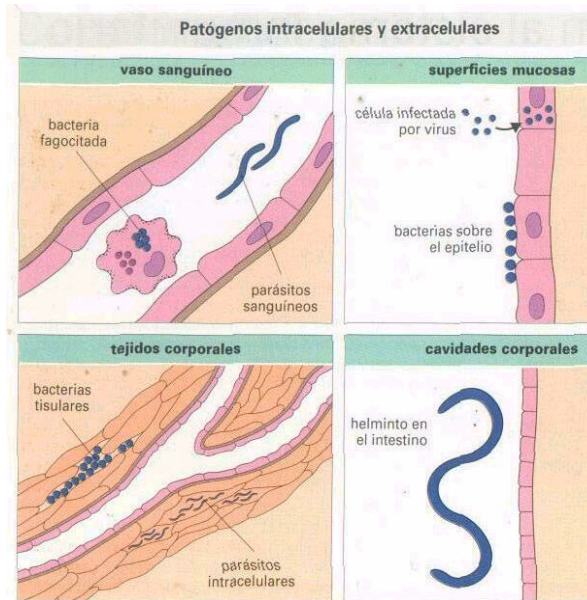
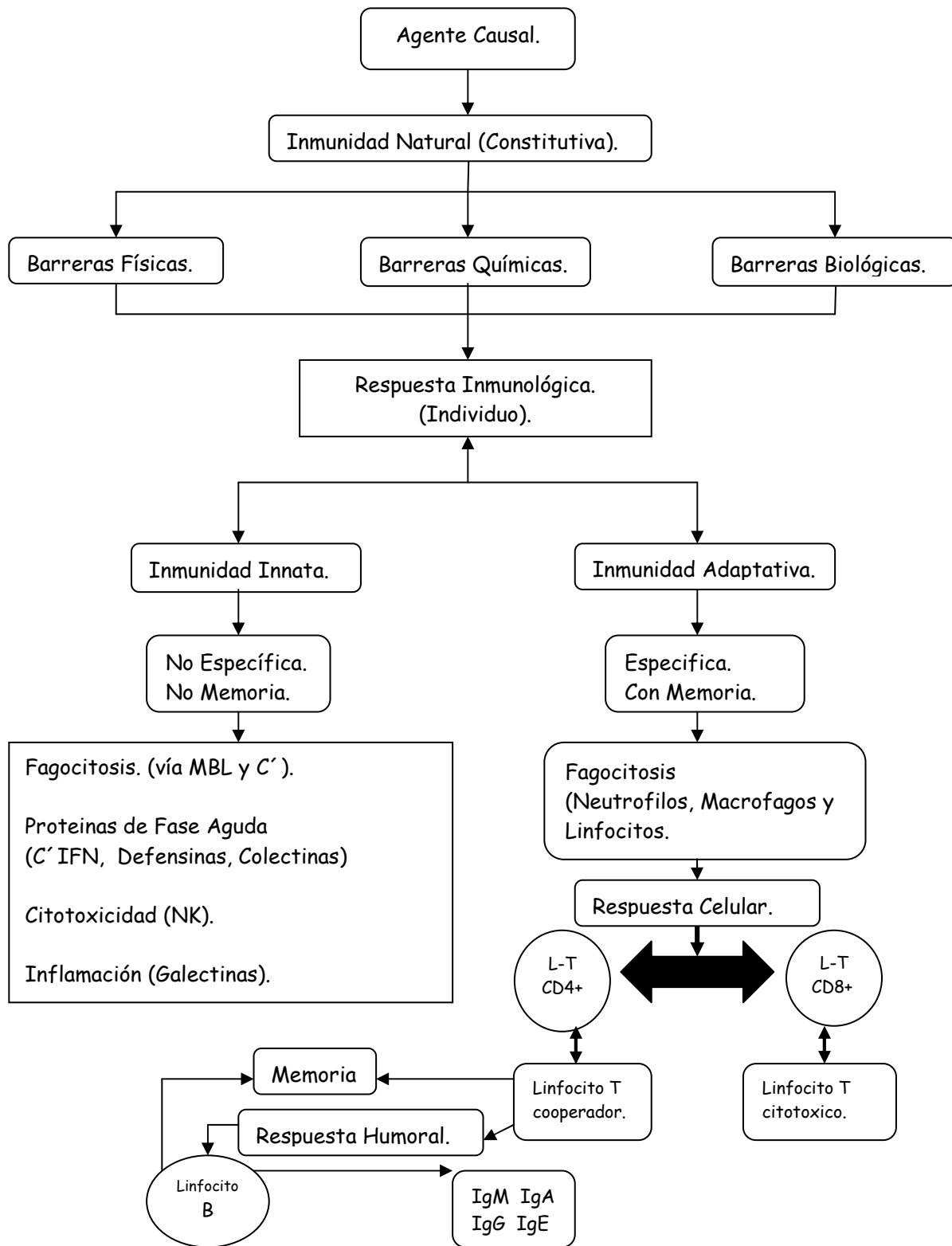


Fig. 1.1. La mayoría de los agentes infecciosos a los que se ve expuesto un individuo no consiguen penetrar en su organismo, sino que son detenidos por una serie de barreras bioquímicas y físicas. El cuerpo humano tolera diversos organismos comensales, que compiten eficazmente con numerosos patógenos potenciales.

DEFENSAS INTERNAS.





JUSTIFICACION.

La elaboración de este manual responde a la necesidad de que los alumnos de la asignatura de Inmunología Especial cuenten con la información necesaria para el adecuado desarrollo de sus conocimientos y habilidades que van adquirir, en dicho laboratorio.

También puede ser de utilidad para los alumnos que cursen la asignatura de Inmunología Diagnóstica que necesiten reproducir algunas técnicas para su proyecto de investigación en dicha asignatura.

Finalmente puede ser una obra de consulta para estudiantes que realizan su servicio social y/o tesis profesional en el área de Inmunología así como investigadores básicos y clínicos que requieran dichas pruebas.

OBJETIVOS.

I. Objetivo General.

Elaborar un Manual de Laboratorio de Inmunología Especial para que los alumnos apliquen los conocimientos teóricos de Inmunología en el desarrollo de las prácticas.

II. Objetivos Particulares.

Este manual deberá guiar a los alumnos en el laboratorio de la asignatura de inmunología especial.

El alumno deberá adquirir los conocimientos necesarios para su aplicación en las prácticas contenidas en este manual y que redundaran en un diagnostico clínico adecuado.

PRÁCTICA No 1

SEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

Objetivo:

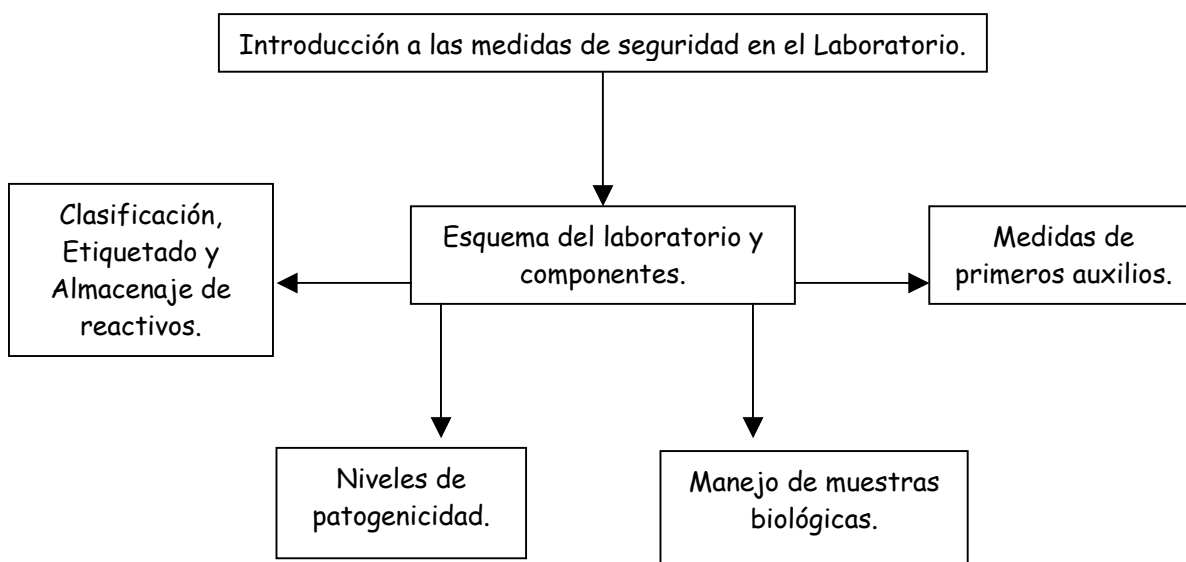
Introducir las medidas de seguridad, químicas y biológicas, en el laboratorio de Inmunología Especial para que el alumno las ponga en práctica y pueda minimizar los riesgos de trabajo.

INTRODUCCIÓN.

En el laboratorio de Inmunología Especial, se indicará al alumno, que normas de seguridad deben seguir en el laboratorio, se le explicará mediante esquemas las partes que conforman el laboratorio, el uso adecuado del equipo, los códigos de identificación de tuberías y almacenaje de reactivos en el laboratorio; así como también se explicarán las medidas de primeros auxilios en caso de que ocurra un accidente, para que el alumno sepa como proceder; del mismo modo se conocerán los niveles de patogenicidad de diversos microorganismos, el manejo adecuado de muestras biológicas.

Todo ello se realiza de forma amena para que el alumno sepa cuidar su integridad y trabaje con precaución con el fin de evitar los accidentes dentro del laboratorio (8).

Fig 1. Diagrama de flujo de medidas de seguridad.



MANEJO DE REACTIVOS^{1,3,7}.

En cualquier laboratorio se manejan reactivos químicos, el manejo de ellos representa un riesgo para todos los trabajadores. De acuerdo con algunas características, se utilizan tres tipos de sistemas para clasificar a las sustancias químicas:

Clasificación de riesgos:

La **NFPA** (Agencia Nacional de Protección del Fuego, de los EUA) a mediados del siglo XX, clasificó los riesgos de las sustancias en tres grandes grupos, asociando a cada riesgo un color y un número que indica la gravedad del riesgo, estos datos son acomodados en un rombo subdividido en 4 rombos.

El Sistema **HMIS** (Siglas en inglés de Sistema de Identificación de materiales Peligrosos), alternativo en EUA, fue creado por la NPCA (Asociación Nacional de Productores de Pinturas y Recubrimientos), utiliza los mismos criterios, colores y niveles, solamente que acomodados en un rectángulo (1,3,7).

Riesgo a la Salud, Color Azul.

Riesgo de inflamabilidad, Color Rojo.

Riesgo de Reactividad, Color Amarillo.

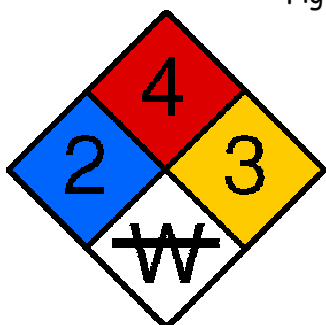
Riesgos Especiales y/o Equipo de protección Personal, Color Blanco.

En cuanto al nivel de riesgos, muy brevemente:

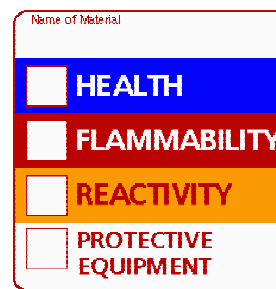
Nivel	0	1	2	3	4
Significado	Nulo*	Ligero	Moderado	Grave	Severo

Estos dos sistemas fueron creados para corregir o solucionar un problema, no para prevenirlo.

Fig 2. Símbolos de la NFPA y HMIS.



Rombo de NFPA



Rectángulo de HMIS

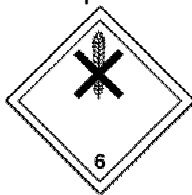
Transporte de Materiales Peligrosos

La ONU (Organización de las Naciones Unidas) avala un Sistema de Identificación para el Transporte de Materiales Peligrosos, este sistema fue creado por el DOT (Departamento de Transporte de EUA) y el CANUTEC (Departamento de Transporte del Canadá). Cada unidad destinada al transporte de materiales debe identificarse con un rombo dentro del cual se localiza un pictograma y el número ONU. En algunos casos el rombo debe ser de un color específico (1). Por ejemplo (ver figura 3).

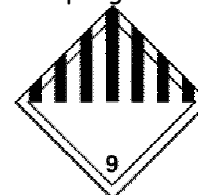
Fig 3. ONU: Sistema de identificación para el transporte de materiales peligrosos.



Inflamable.



**Veneno no mezclar con
alimentos.**



Misceláneos.

Almacenamiento de Reactivos^{1,7}.

Algunas compañías productoras de reactivos químicos idearon un sistema para el almacenamiento de éstos, que en resumen es lo siguiente:

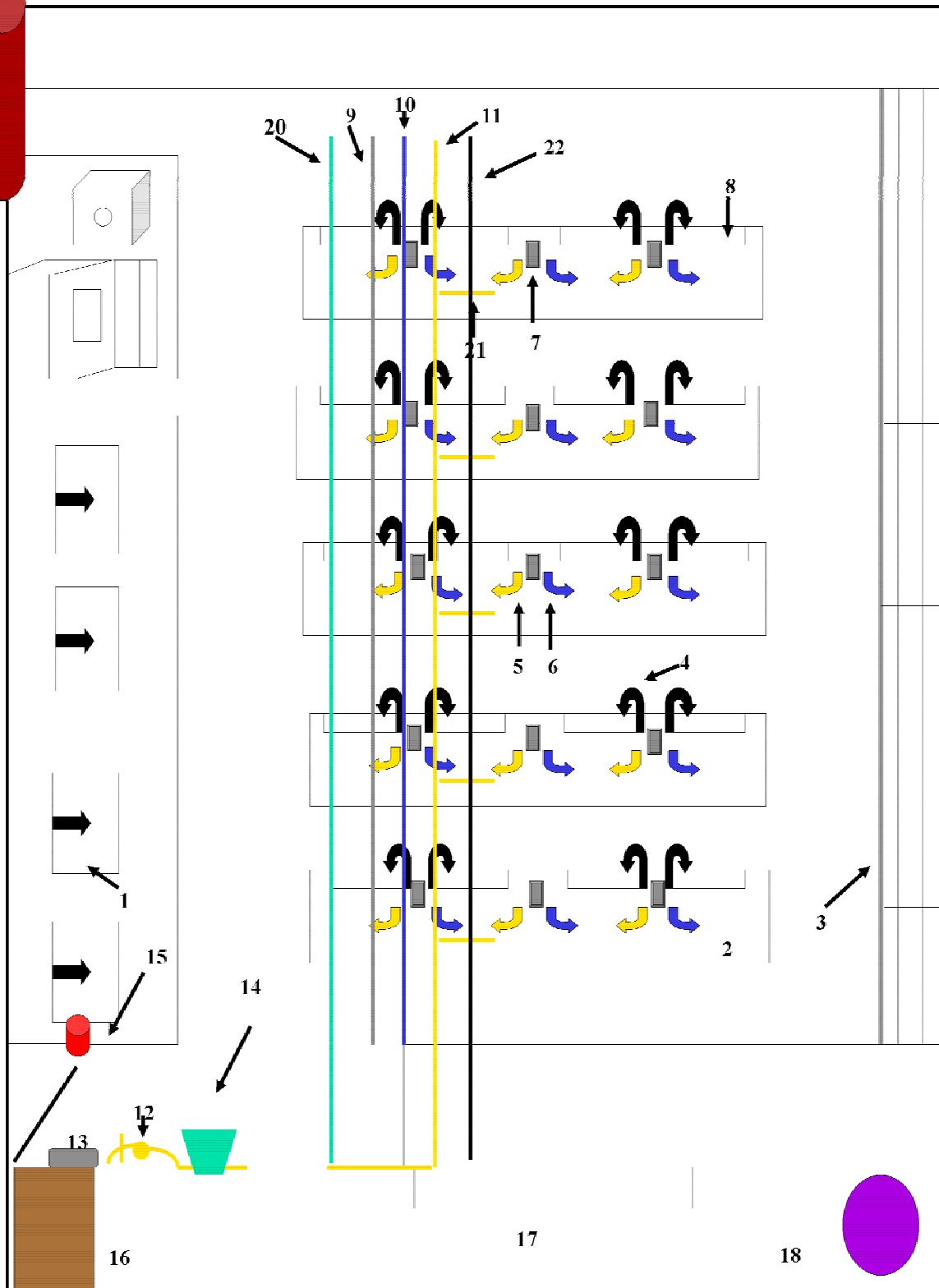
Cuadro 1. Comparación de las áreas de almacenamiento de diferentes sistemas.

Tipo de riesgo	Sistema Baker Saf-T-Data	Sistema Winkler
Salud	Azul	Azul
Inflamabilidad	Rojo	Rojo
Reactividad	Amarillo	Amarillo
Contacto	Blanco	Blanco
General (riesgo menor o igual a 2 en cualquiera de los tipos)	Verde	<i>Gris</i>
Incompatibles con otras del mismo grupo	Color asignado a rayas diagonales	Color asignado y la leyenda SEPARADO

Todos los cuadros que aparecen en las prácticas subsecuentes mencionando las precauciones de los reactivos están basados en el sistema Baker Saf-T-Data.

Fig 4. Esquema del Laboratorio L-511 de la FES-C UNAM Campo 1.

19



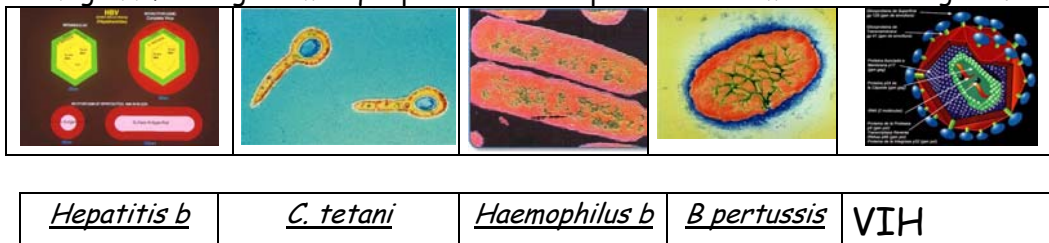
PARTES QUE CONFORMAN EL LABORATORIO L-511.

1. **Tarja de Lavado:** su función es eliminar los residuos del material de laboratorio.
2. **Mesa de Trabajo:** cuenta con llaves de gas y vacío y con tomas de corriente eléctrica y su función es implementar las técnicas a emplear.
3. **Rejillas de Ventilación:** su función es para controlar la dirección del aire y permita la salida de gases.
4. **Llaves de Agua:** sirven para el suministro de la misma.
5. **Llaves de Gas:** sirven para poder disponer del gas y controlar su salida.
6. **Llaves de Vacío:** sirven para succión y filtración.
7. **Tomas de Corriente eléctrica:** sirven para conectar equipo que funciona con corriente eléctrica.
8. **Tarjas de Desecho:** su función para desechar residuos líquidos.
9. **Tubería de Agua (aérea):** para el transporte y distribución del agua a las mesas de trabajo (verde).
10. **Tubería de Vacío (aérea):** para controlar la succión (azul).
11. **Tubería de Gas (aérea):** para el transporte y distribución del gas a las mesas de trabajo (amarillo).
12. **Llave de paso general del Gas:** su función es controlar todo el flujo de gas que se utiliza en el laboratorio.
13. **Pastillas e Interruptores:** su función para controlar la corriente eléctrica.
14. **Manta contra Incendios:** para envolver al sujeto quemado e impedir que siga la combustión.
15. **Extintor:** es de CO₂ y sirve para combatir incendios provocados por líquidos como hidrocarburos, solventes, Pinturas, papel y basura. **Forma de uso:** Desprender el alambre sellador. Quitar el seguro. Apuntar a la base del fuego. Presionar la palanca.
16. **Refrigerador:** para preservar la actividad biológica de muestras y reactivos.
17. **Autoclave:** para la esterilización y descontaminación del material empleado en el laboratorio.
18. **Sistema de Extracción de aire:** facilita de manera más rápida la salida de aire viciado en el laboratorio.
19. **Almacén de Reactivos:** existen dos sistemas de clasificación de reactivos y se incluyen copia de las características, para ser elegidos dependiendo de lo que resulte más adecuado para las necesidades de cada laboratorio.
20. **Tubería aérea para instalación eléctrica (verde).**
21. **Llaves de paso del gas:** son llaves preventivas para mantener cerrado el gas.
22. **Tubería de Drenaje (aérea):** para el transporte y eliminación de los desechos en el laboratorio (gris).

MANEJO DE MUESTRAS BIOLÓGICAS.

La propagación de las infecciones de microorganismos en la sangre ha enfocado las responsabilidades de la organización sanitaria de en el sentido de proteger a los usuarios en el laboratorio de la infección. Se recomienda que se tengan constantemente precauciones ante la sangre y los líquidos corporales de pacientes enfermos, independientemente de su situación de infección hematogena. Los pacientes considerados potencialmente infecciosos, por lo que respecta al virus del VIH y al de la hepatitis b, y otros patogenos hematogenos. Los líquidos corporales como la saliva, heces, secreciones nasales, esputos, sudor, lágrimas, orina y vómitos, a menos que contengan sangre visible. Las precauciones requieren el uso de barreras apropiadas, lo que incluye guantes, batas, máscaras y protecciones oculares, para prevenir la exposición de la piel y a las mucosas cuando existe peligro del contacto con sangre u otros líquidos corporales del paciente. La puesta en práctica de medidas de precaución en el manejo de las muestras biológicas es el correcto puesto de guantes al realizar la toma de sangre de un paciente así como la manipulación correcta de las agujas y por seguridad los guantes, jeringas o vacutainers, agujas y algodones o gasas deben estar nuevos estériles en empaques cerrados para evitar una posible contaminación e infección (2).

Fig 5. Microorganismos que pudieran estar presentes en muestras biológicas.



NIVELES DE PATOGENICIDAD.

Ya que muchos agentes pueden ser patógenos para los seres humanos, animales u otras formas de vida, su utilización posee riesgos que varían dependiendo de cada agente y del modo de utilización.

Los patrones de seguridad han sido diseñados para reducir, a niveles aceptables, los riesgos inherentes a la utilización de materiales peligrosos. Se han seleccionado patrones estrictos para agentes peligrosos y menos estrictos para agentes que producen solamente problemas leves. Por tanto, los patrones de seguridad son compromisos diseñados para permitir que el trabajo necesario se realice con una exposición de mínimo riesgo tanto para las personas que lo realizan como para los demás (2).

PELIGRO BIOLÓGICO.

En la función de riesgo biológico se incluyen los agentes infecciosos o etiológicos (que producen enfermedades), los materiales potencialmente infecciosos, ciertas toxinas y otros materiales biológicos peligrosos (2).

Cuadro 2. Clasificación de agentes peligrosos en base al grupo de riesgo.

Grupo de Riesgo	Riesgo para el individuo y la comunidad
1 (GR-1)	Agentes que no están asociados con enfermedades en humanos adultos sanos
2 (GR-2)	Agentes asociados a enfermedades humanas que son raramente graves y para los que se dispone, con frecuencia, de intervenciones preventivas y/o terapéuticas
3 (GR-3)	Agentes asociados con enfermedades humanas graves o letales para los que se puede disponer de intervenciones preventivas o terapéuticas (elevado riesgo individual pero bajo riesgo para la comunidad)
4 (GR-4)	Agentes que probablemente causan enfermedades humanas graves o letales para los que normalmente no se dispone de acciones preventivas o terapéuticas (alto riesgo individual y alto riesgo para la comunidad)

Entre los agentes del GR-1 se incluyen microorganismos como *Escherichia coli* y *Saccharomyces cerevisiae*.

En general los agentes del GR-2 se manipulan con un nivel de Bioseguridad NB-2 y los agentes del GR-3, con un NB-3. Sin embargo, la manipulación en grandes cantidades de agentes del GR-2 podría requerir unas condiciones de NB-3, mientras que algunos agentes del GR-3 podrían manipularse de forma segura a un NB-2 bajo ciertas condiciones.

La bioseguridad define las condiciones bajo las cuales los agentes infecciosos se pueden manipular con seguridad (2).

El objetivo de la contención es confinar los peligros biológicos y reducir la exposición, de las personas que trabajan en el laboratorio, las personas que están fuera del laboratorio y el medio ambiente a agentes infecciosos en potencia (2).

Cuadro 3. Niveles de bioseguridad en el laboratorio.

Nivel de Bioseguridad 1 (NB - 1)	
Agentes:	No se conoce que causen enfermedades en adultos
Método de Trabajo:	Métodos estándar en Microbiología
Equipo de Seguridad: (Barrera Primaria)	No se requiere
Instalaciones: (Barrera Secundaria)	Banco de laboratorio con fregadero
Nivel de Bioseguridad 2 (NB - 2)	
Agentes:	Asociados a enfermedades humanas <i>Riesgos de exposición: autoinoculación, ingestión, exposición de las membranas mucosas</i>
Método de Trabajo:	Además de las contenidas en el NB - 1: Acceso restringido, anuncios de riesgo biológico
Equipo de Seguridad: (Barrera Primaria)	Barreras Primarias: Cabinas de Seguridad Biológicas de Clase I ó II u otros dispositivos para la contención física utilizados para la manipulación de agentes que producen salpicaduras o aerosoles de materiales infecciosos; Equipos de Protección Personal: bata de laboratorio, guantes, de protección para la cara y ojos si fuera necesario
Instalaciones: (Barrera Secundaria)	Además de las contenidas en el NB - 1: Tener disponible una autoclave.
Nivel de Bioseguridad 3 (NB - 3)	
Agentes:	Agentes autóctonos o exóticos con posible transmisión aérea; las enfermedades deben tener consecuencias graves o letales
Método de Trabajo:	Además de las contenidas en el NB - 1: Acceso controlado, descontaminación de todos los residuos; descontaminación de la ropa de protección antes de su lavado; controles de suero
Equipo de Seguridad: (Barrera Primaria)	Barreras Primarias: Cabinas de Seguridad Biológicas de Clase I ó II u otros dispositivos para la contención física utilizados para la manipulación de agentes; Equipos de Protección Personal: bata de laboratorio, guantes, de protección para la cara y ojos y protección respiratoria si fuera necesario.
Instalaciones: (Barrera Secundaria)	Además de las contenidas en el NB - 2: Separación física de los pasillos de acceso; cierre automático, doble puerta de acceso; aire sin recirculación, flujo negativo de aire en el laboratorio

Cuadro 4. Clasificación de los agentes patógenos.

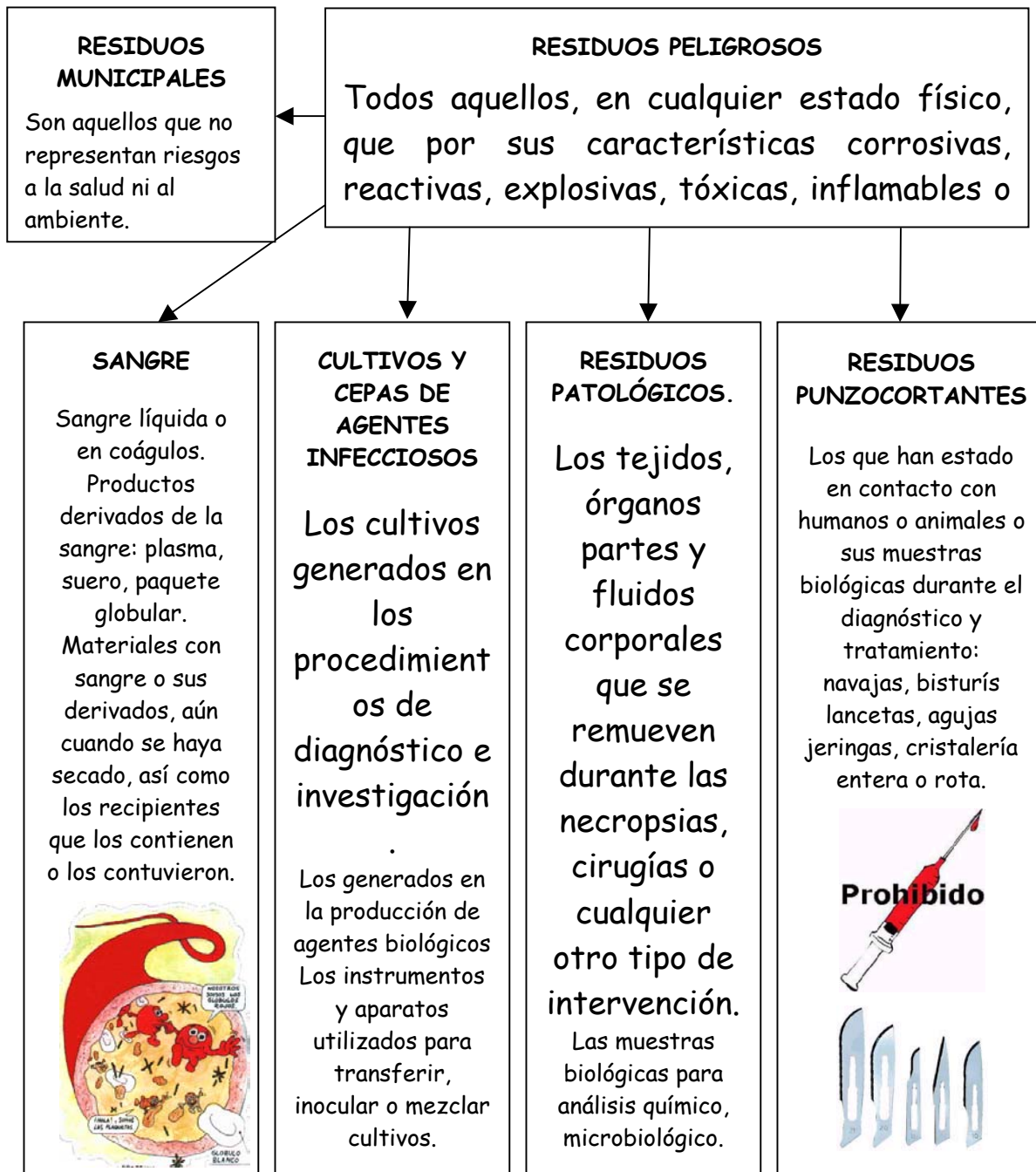
NIVEL 1.			
BACTERIAS	PARÁSITOS	HONGOS	VIRUS
<i>Escherichia coli</i>	<i>Iodamoeba butchlii</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	<i>Calciviridae</i>
<i>Aerobacter</i>	<i>Endolimax nana</i>	<i>Malassesia furfur</i>	<i>V La Crosse</i>
<i>Klebsiella</i>	<i>Dientamoeba fragilis</i>	<i>Candida albicans</i>	<i>Coxsackie A</i>
Listeria	<i>Enterobius vernicularis</i>	<i>Pedraia hortai</i>	<i>Coronavirus</i>
NIVEL 2			
<i>Salmonella</i>	<i>Toxoplasma gondii</i>	<i>Aspergillus flavus</i>	<i>Rhadoviridae</i>
<i>Shigella</i>	<i>Cryptosporidium ssp</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>	<i>Papoviridae</i>
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Isospora belli</i>	<i>Penicillium ssp</i>	<i>Adenoviridae</i>
<i>Streptococcus B hemolitico</i>	<i>Giardia lamblia</i>	<i>Trichophyton rubrum</i>	<i>Newcastle</i>
<i>Moraxella</i>	<i>Hymenolepis nana</i>	<i>Aspergillus Níger</i>	<i>Varicela zoster</i>
NIVEL 3.			
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<i>Taenia solium</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Influenza A</i>
<i>Brucella</i>	<i>Toxocara canis</i>	<i>Hystoplasma capsulatum</i>	<i>Hepatitis B</i>
<i>Clostridium tetani</i>	<i>Ascaris lumbricoides</i>	<i>Sporothricosis schenckii</i>	<i>Poliovirus</i>
<i>Clostridium botulinium</i>	<i>Entamoeba hystolitica</i>	<i>Blastomyces dermatitis</i>	<i>Citomegalovirus</i>
<i>Haemophilus influenzae</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Coccidiodes immitis</i>	<i>Hepatitis C</i>
<i>Treponema pallidum.</i>	<i>Uncinarias</i>	<i>Cladosporium</i>	<i>Rotavirus</i>
<i>Mycobacterium ulcerans</i>	<i>Balintidium coli</i>	<i>Nocardia brasiliensis</i>	<i>Herpes</i>
NIVEL 4.			
<i>Vibrio cholerae</i>	<i>Plasmodium ssp</i>	<i>Actynomycetos</i>	<i>VIH</i>
<i>Micobacterium tuberculosis</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Hystoplasma capsulatum</i>	<i>HTLV</i>
<i>Bacillus anthraxis</i>	<i>Leishmania chagasi</i>	<i>Blastomyces dermatitis</i>	<i>Flavoviridae (Ebola)</i>
<i>Pseudomona aeruginosa</i>	<i>Onchocerca volvulus</i>	<i>Coccidiodes immitis</i>	<i>Dengue</i>
<i>Mycobacterium intracellulareavium</i>	<i>Taenia solium (cisticercosis neural)</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Virus del papiloma papovaviridae</i>

Cualquier persona que entre al laboratorio debe entender los riesgos biológicos y otros riesgos con los que se pueden encontrar durante su trabajo normal en el laboratorio y estar enterados en las precauciones de seguridad y procedimientos apropiados (2).

RESIDUOS BIOLÓGICOS².

En un laboratorio escolar, como el que se utiliza para la asignatura de inmunología especial, o uno de diagnóstico clínico se generan residuos de diferentes tipos, cada uno de los cuales requiere diferentes condiciones para su recolección, traslado, almacenamiento y disposición definitiva:

Fig 6. Diagrama de los residuos biológicos.



La **NOM-087-ECOL-SSA1-2002**, titulada "Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo" establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de este tipo de residuos, en forma muy esquemática los residuos deben ser tratados de la siguiente forma:

PRECAUCIONES UNIVERSALES^{2,4,5}.

La sangre y los líquidos corporales, de todos los pacientes, deben considerarse como potencialmente infecciosos, ya que pueden estar infectados con VIH, VHB u otros patógenos.

Cuadro 5. Medidas de prevención y de contención para accidentes con residuos biológicos

MEDIDAS DE PREVENCIÓN DE ACCIDENTES CON RESIDUOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS	QUÉ HACER SI OCURRE UN ACCIDENTE CON RESIDUOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS
<p>Lavarse las manos antes y después de tener contacto con cualquier paciente.</p> <p>Restringir comer, beber, fumar, aplicar maquillajes o cremas en áreas de trabajo.</p> <p>No almacenar alimentos y bebidas en refrigeradores donde se encuentre sangre u otros materiales potencialmente infecciosos.</p> <p>Usar guantes siempre que exista la posibilidad de tener contacto con líquidos de alto riesgo.</p> <p>Usar bata, delantales y ropa impermeable, cuando exista la posibilidad de contaminar la ropa con líquidos de alto riesgo.</p> <p>Desechar agujas y otros objetos punzo cortantes en contenedores rígidos para este fin.</p>	<p>Evaluación médica posterior a la exposición.</p> <p>Documentar cómo ocurrió el accidente.</p> <p>Identificar y documentar la fuente de sangre o muestra contaminada que causó el accidente.</p> <p>Obtener el consentimiento del paciente, para hacer la determinación del VIH y VHB; tan pronto como sea posible, documentar los resultados del análisis.</p> <p>Notificar al empleado los resultados de las pruebas y que se hagan las recomendaciones pertinentes.</p> <p>Realizar las pruebas de VIH y VHB al empleado para obtener su estado serológico.</p> <p>Al médico que atienda al empleado que sufrió el accidente, se le debe proporcionar toda la información necesaria, para darle seguimiento al estado de salud del empleado.</p>

Cuadro 6. Tipos de recolección de residuos biológicos.







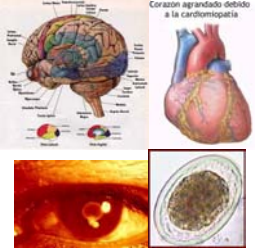

INTERNA	EXTERNA
<p>Los residuos nunca deben ser compactados.</p> <p>Las bolsas y contenedores recolectados deben de estar llenos al 80% de su capacidad.</p> <p>El personal que realice esta labor deberá contar con equipo de protección personal.</p>	<p>Evitar rutas de alto riesgo.</p> <p>Determinar el recorrido más corto posible entre el lugar donde se genera y almacena.</p> <p>Contar con los carros de diseño adecuado.</p> <p>Recolección y transporte higiénicos y rápidos.</p> <p>Identificar carros de recolección.</p> <p>Recolectar RPBI separados de los municipales.</p>

ALMACENAMIENTO.

Se deberá destinar un área apropiada para el almacenamiento temporal de los residuos peligrosos biológico-infecciosos, de acuerdo con la cantidad de residuos generados, los establecimientos se clasifican en tres niveles (2,4,5).

Los residuos peligrosos biológico-infecciosos envasados deberán almacenarse en contenedores metálicos o de plástico, con tapa, y ser rotulados con el Símbolo Universal de Riesgo Biológico, con la leyenda "RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS"(2,4,5).

Cuadro 7. Los diferentes tipos de empaque de residuos biológicos.

Tipo de Residuo.	Estado Físico.	Tipo de Envase.	
Sangre, Cultivos y Cepas	<p>Líquido Semisólido</p> 	Bolsa roja de polietileno	
Líquidos Herméticos: Orina, Secreciones de Vías Respiratorias, Líquido Cefalorraquídeo y Linfa	<p>Líquidos.</p> 	Bolsa amarilla de polietileno	
Instrumentos Punzocortantes	<p>Sólidos.</p> 	Contenedor sólido rígido de polipropileno rojo	
Desechos Patológicos sólidos incluyendo materia fecal	<p>Sólidos.</p> 	Contenedor sólido rígido de polipropileno amarillo	

El periodo de almacenamiento temporal estará sujeto al tipo de establecimiento generador, como sigue:

Nivel I: Máximo 30 días.

Nivel II: Máximo 15 días.

Nivel III: Máximo 7 días.

Las áreas destinadas al almacenamiento de residuos deben contar con señalamientos y letreros alusivos a la peligrosidad de los mismos, en lugares y formas visibles, el acceso a esta área sólo se permitirá al personal responsable de estas actividades. El diseño, construcción y ubicación de las áreas de almacenamiento temporal, destinadas al manejo de RPBI en las empresas prestadoras de servicios, deberán ajustarse a las disposiciones señaladas, en la Norma, y contar con la autorización correspondiente por parte de la SEMARNAT.

La recolección y el transporte de los RPBI referidos en esta Norma Oficial Mexicana, deberá realizarse conforme a lo dispuesto en los ordenamientos jurídicos aplicables y cumplir lo siguiente: a) Sólo podrán recolectarse los residuos que cumplan con el envasado, embalado y etiquetado o rotulado como se establece en la Norma Oficial Mexicana, b) Los residuos peligrosos biológico-infecciosos no deben ser compactados durante su recolección y transporte, c) Los contenedores deben ser desinfectados y lavados después de cada ciclo de recolección (4,5).

BIBLIOGRAFÍA.

1. J.T,BAKER,SAF-DATA™ Unique Safety Labeling, <http://www.jtbaker.com/safety/features/all-saftdatahtml> (consulta el 14 de Marzo del 2006).
2. GONZALEZ BONILLA, CELIA. 2000. Manual para el Manejo de Residuos Peligrosos y Bioseguridad. 1ª edición. Editorial SSA, INDRE. México, DF. 83 pp.
3. Norma Oficial Mexicana NOM-018-STPS-2000 sistema para la identificación y comunicación de peligros y riesgos por sustancias químicas peligrosas en los centros de trabajo.
4. Norma Oficial Mexicana NOM-052-ECOL-1993, que Establece las características de los residuos peligrosos, el listado de los mismos, y los límites que hacen a un residuo peligroso por su toxicidad al ambiente.
5. Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995, que establece los requisitos para la separación, envasado, almacenamiento, recolección, transporte, tratamiento y disposición final de los residuos peligrosos biológico-infecciosos que se generan en establecimientos que presten atención médica y dental.
6. Oklahoma State University Laboratory Safety Manual 2005.
7. University of Oregon NFPA 704 Hazard Identification System <http://chemlabs.uoregon.edu/safety/nfpahtml> (consulta el 14 de Marzo del 2006).
8. ZARCO RUBIO ESTHER. 1998 Seguridad en laboratorios 2ª edición. Editorial trillas, México, DF. 152pp.

PRÁCTICA No 2

CONTEO DE LEUCOCITOS Y CUENTA DIFERENCIAL DE LA SERIE BLANCA.

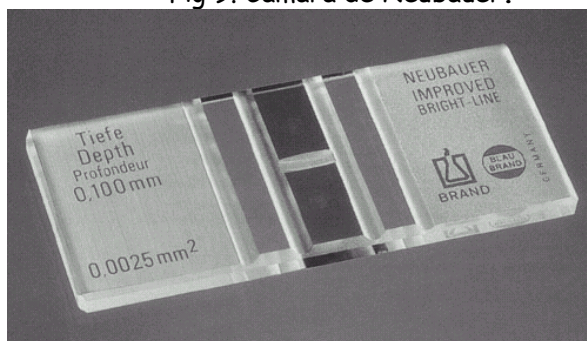
Objetivo:

Es conocer la cantidad de leucocitos y la cuenta diferencial morfológica de los diferentes tipos de leucocitos en la sangre para dar un oportuno diagnóstico.

INTRODUCCIÓN.

Conteo de Leucocitos consiste en un exámen fundamental que se realiza de manera sistemática, y estriba en el recuento de leucocitos utilizando la cámara cuadrículada de Neubauer y se refiere tan solo a la concentración total de leucocitos en sangre. La cámara de Neubauer es un grueso portaobjetos de cristal en cuyo tercio medio están fijadas tres plataformas paralelas que se extienden a lo largo de su superficie. La plataforma central está subdividida por una ranura transversal en dos mitades, cada una más ancha que las dos plataformas laterales y separadas de ellas y entre sí por fosos. Los cuatro cuadrados de las esquinas se utilizan para el recuento leucocitario y están subdivididos en dieciséis cuadrados terciarios. Se monta la cámara de Neubauer, y se coloca por encima de la cámara donde están los cuadros un cubreobjetos que forma un plano perfecto, acompaña la cámara de recuento, cuando el cubreobjetos esta situado sobre la plataforma de la cámara, hay un espacio de 0.1 mm de espesor entre el cubreobjetos y la plataforma. Para realizar este conteo se emplea la solución de Turk que es para conservar los leucocitos y lisar los eritrocitos (1).

Fig 9. Cámara de Neubauer.



Cuenta Diferencial consiste en evaluar la cantidad diferencial y morfológica de los diferentes tipos de leucocitos que hay en sangre periférica. El examen de extensión de sangre es una parte importante de la evaluación de la serie blanca, la fiabilidad de la información obtenida depende en gran parte de lo bien hechas y bien teñidas que estén las extensiones, las cuales son sistemáticamente examinadas. Se describe el método de tinción de Wright. Los colorantes de anilina, ampliamente usados en los estudios de la sangre, son de dos tipos generales; los básicos, como el azul de metileno, y los ácidos como la eosina. Los núcleos y algunas otras estructuras de la sangre se tiñen con los básicos, por que se denominan basófilos. Ciertas estructuras sólo toman los colorantes ácidos y se llaman acidófilos o eosinófilos. Otras estructuras se tiñen por una combinación de ambos y se denominan neutrófilos (1).

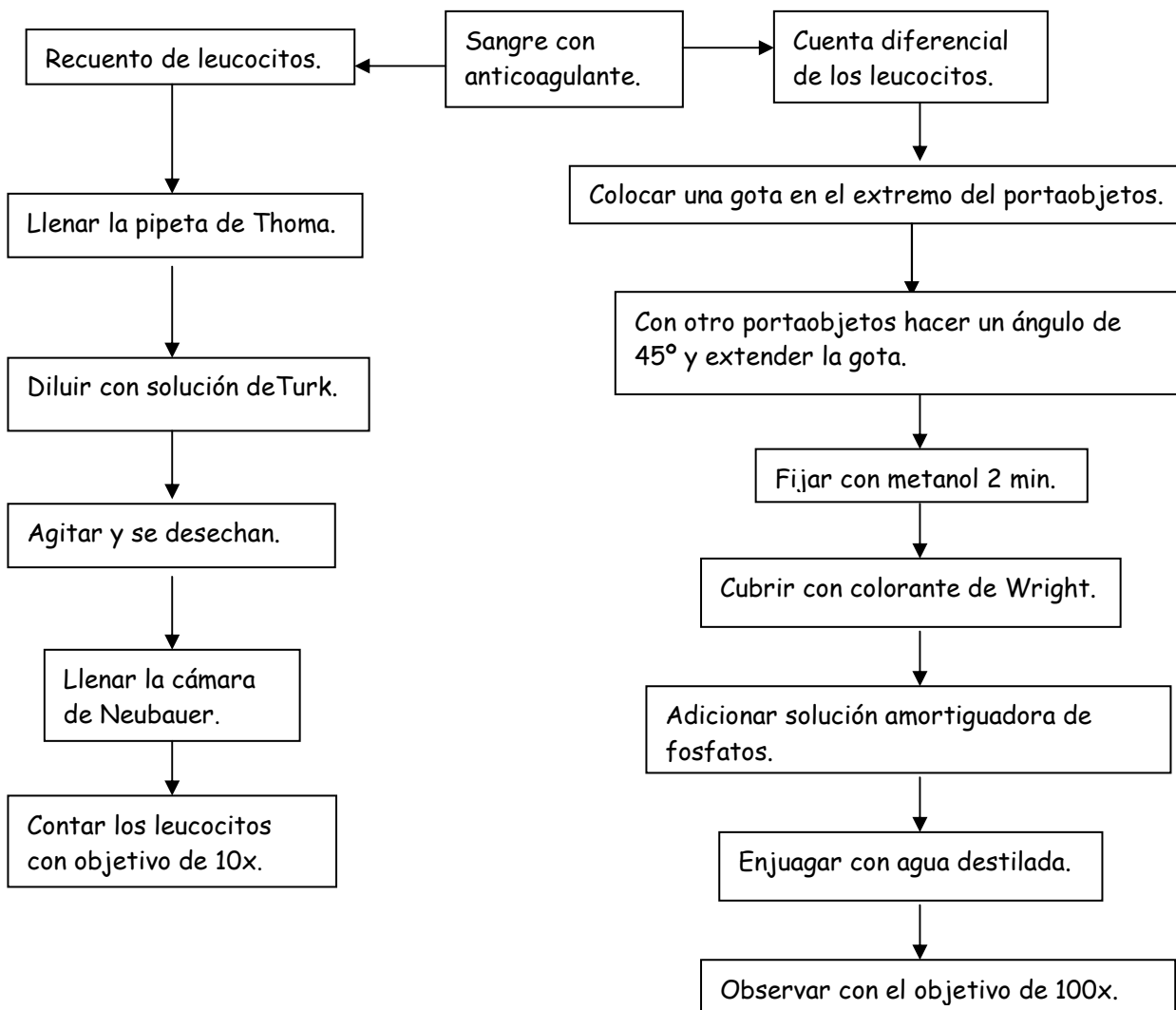
MATERIAL.

Cámara de Neubauer.
Pipeta de Thoma para leucocitos.
Caja de Petri humedecida.
Algodón, para el exceso de sangre ó líquidos.
Microscopio.
Portaobjetos: (bien limpio, desengrasado, seco y bordes lisos).
Tubo Capilar.
Algodón.
Piano Contador.


REACTIVOS.

Solución de Turk.
EDTA.
Colorante de Wright.
Aceite de Inmersión.
Buffer de Fosfatos con pH 6.6.
Agua destilada.

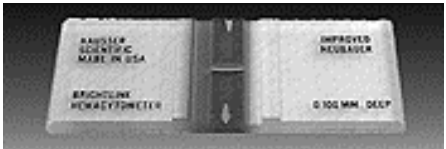
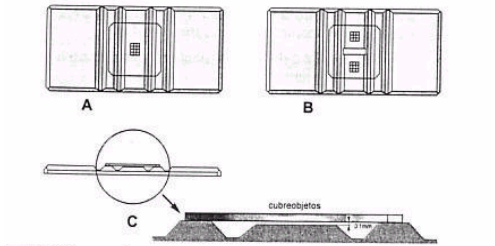
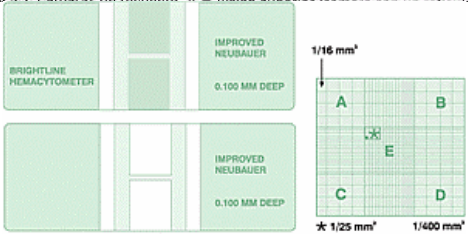
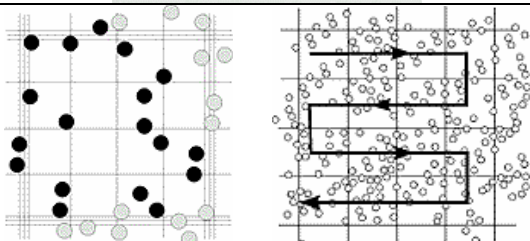
Fig 10. Diagrama de flujo del conteo de leucocitos y la cuenta diferencial.



METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ^{1,2,3}

<p>Toma una muestra de sangre en sistema vacutainer con EDTA como anticoagulante.</p>	
---	---

1. Conteo de leucocitos.

<p>1. Se llena la pipeta de Thoma para leucocitos hasta la marca de 0.5, se limpia con algodón el exceso de sangre.</p> <p>2. Se llena nuevamente la pipeta de Thoma hasta la marca de 11 con la solución de Turk.</p>	
<p>3. Mezclar y desechar las tres primeras gotas.</p> <p>4. Llenar la cámara dejando caer una gota en el borde del cubreobjetos en ambos lados de la cámara el extremo del tubo de la pipeta de Thoma que contiene la mezcla es llevado hasta la ranura en el borde del cubreobjetos, el líquido se desliza bajo el cubreobjetos por atracción capilar y penetra en la cámara de forma controlada.</p>	 <p style="font-size: small; text-align: center;">Fig. 5.1. Cámaras de recuento. A - Un tubo succionado de la pipeta de Thoma.</p>
<p>5. Dejar reposar, las células deben asentarse en la cámara durante 1 min.</p> <p>6. Montar la cámara de Neubauer al microscopio y observar con el objetivo de 10x.</p> <p>7. Se realiza el recuento, se cierra parcialmente el diafragma condensado y se abre del microscopio para hacer que los leucocitos resalten con nitidez utilizando el objetivo de 10x y se empieza a contar los leucocitos de los cuadros grandes situados en los extremos.</p>	
<p>8. El conteo de los leucocitos se realiza desde el primer extremo del campo de las cuadrículas hasta el ultimo en forma de culebra recorriendo todas las 16 cuadrículas en cada uno de los cuatro cuadros.</p>	

2. Cuenta diferencial de la serie blanca.


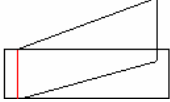
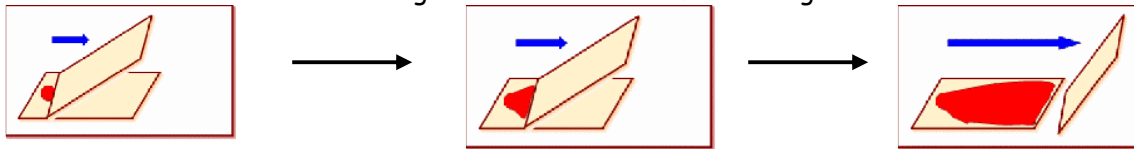
<ol style="list-style-type: none"> 1. Tomar una muestra de sangre con un tubo capilar. 2. Colocar una gota del tubo capilar en el extremo del portaobjetos. 	
<ol style="list-style-type: none"> 3. Luego en la zona donde se colocó la muestra sanguínea, con el borde del otro portaobjetos extenderla por capilaridad y formar un ángulo de 45°. 4. Hacer el barrido y recorrer la muestra con el otro portaobjetos con un movimiento suave, hacer la extensión de sangre lo más delgada y fina que se pueda. 	

Fig 11. Extensión de un frotis sanguíneo.





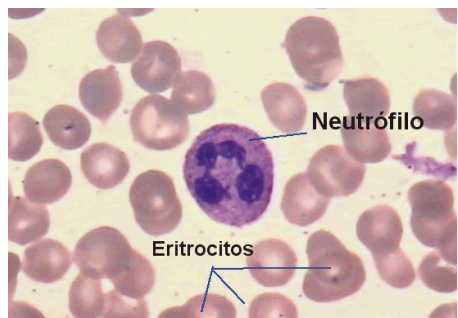
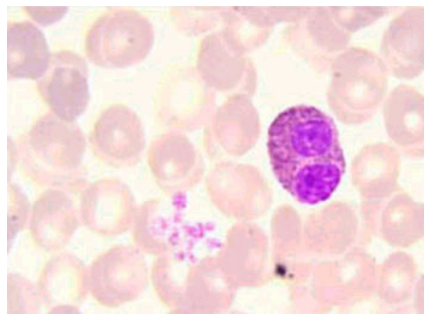
<ol style="list-style-type: none"> 5. Secar al aire rápidamente. 6. Fijar con metanol durante 2 min. 7. Cubrir con colorante de Wright por 5-8 min. 8. Agregar buffer sin tirar el colorante durante 7-10 min, hasta que se forme una capa metálica que lo cubra. 9. Enjuagar con agua destilada y secar. 	
<ol style="list-style-type: none"> 10. Colocar una gota de aceite de inmersión al centro. 11. Observar al microscopio con el objetivo 100x. 12. Realizar la cuenta diferencial de los leucocitos. 13. Al realizar la cuenta diferencial mover el portaobjetos en culebra para poder apreciar todo el campo del frotis sanguíneo. 	

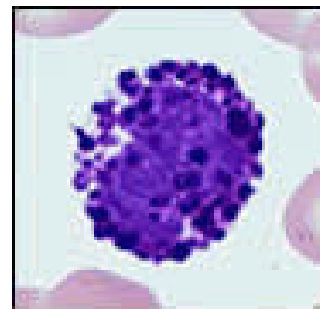
Fig 12. Imágenes de los diferentes tipos de leucocitos en la sangre.



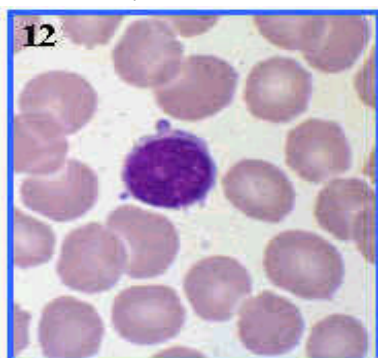
Neutrófilos



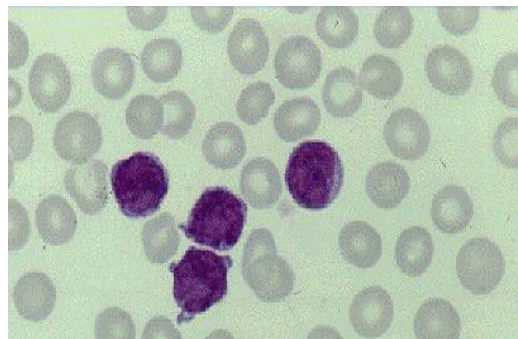
Eosinófilos



Basófilos



Monocitos



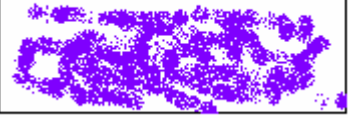

Linfocitos

PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ¹.

1. Cuenta de Leucocitos.

1. Tener cuidado al succionar la muestra de sangre con la pipeta de Thoma, tiene que ser despacio sin rebasar la marca de 0.5.
2. Tener cuidado al succionar la solución de Turk con la pipeta de Thoma, igualmente se realiza despacio sin rebasar la marca de 11 en caso de haber error repetir todos los pasos anteriores.
3. Siempre se tienen que desechar las tres primeras gotas.
4. Cuando se monta la cámara de Neubauer, se coloca el cubreobjetos en forma centrada.
5. Evitar que el líquido situado debajo del cubreobjetos rebase los bordes o se formen burbujas.
6. Las células deben asentarse en la cámara de Neubauer durante un min examinando con el objetivo de bajo aumento el área rotulada para ver si están distribuidas regularmente, si no se repetirá el procedimiento.
7. Si la cámara esta llena y las células no se cuentan enseguida, se debe proteger el líquido contra la evaporación, colocando la cámara en una caja petri con papel filtro con SSF.
8. Al montar la cámara de Neubauer al microscopio y al observar con el objetivo de 10x disminuir el tono de la luz o ajustar la intensidad de la luz se realiza cerrando el diafragma para regular la luz.

2. Cuenta diferencial de la serie blanca.

<p>1. Al realizar el barrido con el otro portaobjetos se debe tener firme la mano porque si no el frotis sale muy irregular y dispersado y no sirve para teñirse.</p>	
<p>2. Si se coloca un exceso de muestra en el portaobjeto al realizar el barrido sale un frotis muy grueso y al teñirse no se pueden apreciar los leucocitos. 3. Los frotis sanguíneos se deben teñir inmediatamente a la preparación. 4. Después de fijar con metanol por 2 min, al teñirlo con colorante de Wright, la tinción debe ser uniforme.</p>	

5. Si hay exceso de colorante de Wright se pueden presentar dos casos:

Caso A

La tinción es excesivamente azulada. Los frotis gruesos, el tiempo prolongado de tinción, el lavado inadecuado o la alcalinidad demasiado alta del colorante tienden a provocar una basofilia excesiva. Los eritrocitos se ven de color azul o verde, los gránulos de los neutrófilos quedan fuertemente teñidos y presentan un aspecto grande y prominente.

Caso B

La tinción es excesivamente rosada. La tinción insuficiente, el tiempo de lavado prolongado o la acidez del colorante es demasiado alta pueden provocar acidofilia excesiva en tales tinciones los eritrocitos aparecen de color rojo brillante o naranja. Los gránulos de los eosinófilos muestran un color rojo brillante o naranja.

6. Al colocar la gota de aceite de inmersión debe ser solo una gota de aceite por que un exceso de aceite causa una vista muy opaca al frotis no se aprecian bien los leucocitos entonces se estropea el frotis.

Cuadro 9. Riesgo de los reactivos de la práctica No 2.

	Ácido Acético	Buffer de Fosfatos	Metanol	Colorante de Wright
SALUD	3	2	3	3
INFLAMABILIDAD	2	0	3	3
REACTIVIDAD	2	1	1	1
CONTACTO	4	2	3	3
EPP	C Eb	A	C Eb	C Eb
ALMACENAJE	ROJO	VERDE	ROJO	ROJO

RESULTADOS.

Cuadro 10. Conteo de los leucocitos.

EQUIPO	PACIENTE	SEXO	No de Leucocitos/mm ³

Valores de Referencia. Hombres y mujeres 5.0-10.0x10³ Leucocitos/mm³.

Cuadro 11. Cuenta diferencial de los leucocitos.

Tipos de Leucocitos	Neutrófilos segmentados	Neutrófilos en banda	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
Valores de Referencia	55-65%	3-5%	20-30%	4-8%	1-4%	0-1%
Paciente y sexo						

Los cálculos deben ser en base al conteo del piano. El total deben ser 250 leucocitos, por que a mayor cantidad de células los valores son más reales.

También se tienen que calcular los valores absolutos, se multiplica el porcentaje de leucocitos por el total de leucocitos/mm³.

Cuadro 12. Tabla de valores absolutos.

Tipo de Leucocitos	Neutrófilos segmentados	Neutrófilos en banda	Linfocitos	Monocitos	Eosinófilos	Basófilos
Valores de Referencia						
Paciente y sexo						

BIBLIOGRAFÍA.

1. BERNARD, HENRY JOHN. 1993. Diagnóstico y Tratamiento Clínico por el Laboratorio, 9ª edición, Ed Salvat Medicina, México, DF. 1509 pp.
2. VELEZ A, HERNAN. 1992. Fundamentos de Medicina Hematología. 4ª edición. Editorial Corporación para Investigaciones Biológicas. Medellín, Colombia. 395 pp.
3. WILLIAMS, WILLIAM J. 1979. Hematología. 1ª edición. Salvat Editores, S.A. Barcelona, España. 1503 pp.

PRÁCTICA No 3 FAGOCITOSIS.

Objetivo:

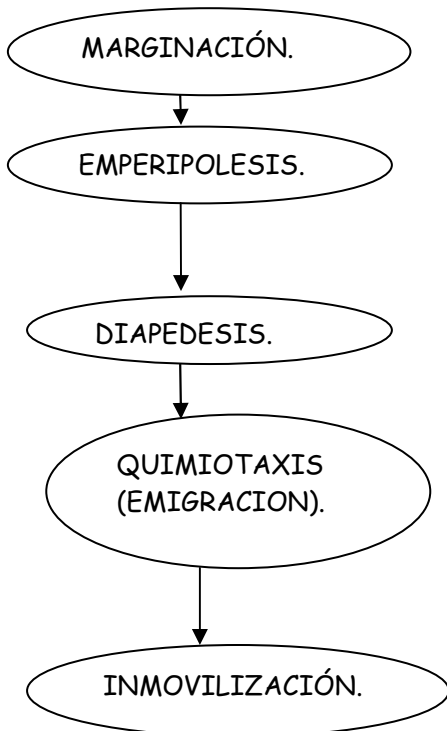
Detectar las inmunodeficiencias primarias en monocitos y neutrófilos se evaluará la función fagocitaria en células de sangre periférica en los humanos a través de la medición de: a) número de células fagocitantes, b) porcentaje de células con capacidad fagocítica, c) porcentaje de células con capacidad de producción de sustancias microbicidas, d) el número de levaduras fagocitadas.

INTRODUCCIÓN.

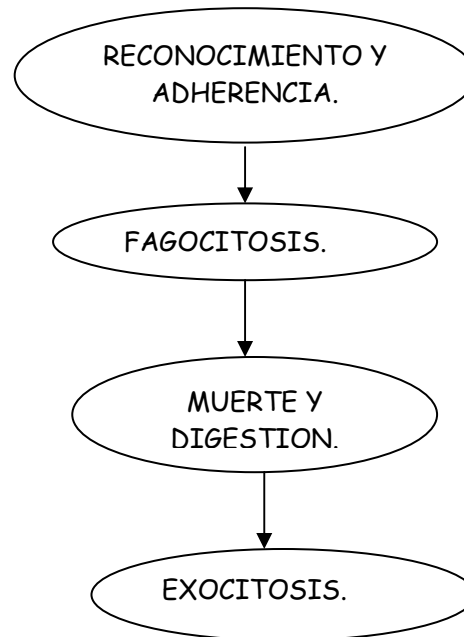
La **fagocitosis** es el proceso de ingestión de sustancias particuladas realizado por células de origen mesenquimatoso. Esencialmente existen dos tipos principales de células fagocitarias en los organismos superiores: 1) neutrófilos y 2) fagocitos mononucleares o monocitos y macrófagos. Ambos tipos celulares se originan en la médula ósea y surgen de células madres comunes pluripotenciales. El hábitat natural de los neutrófilos y monocitos es la sangre periférica, y varios tipos de macrófagos se encuentran en los tejidos. Los neutrófilos son células terminales de vida limitada, y los macrófagos de los tejidos viven más tiempo y son capaces de dividirse y transformarse en nuevas formas celulares (2,3).

Fig 13. Cascada del proceso fagocítico.

CASCADA DE MIGRACIÓN.

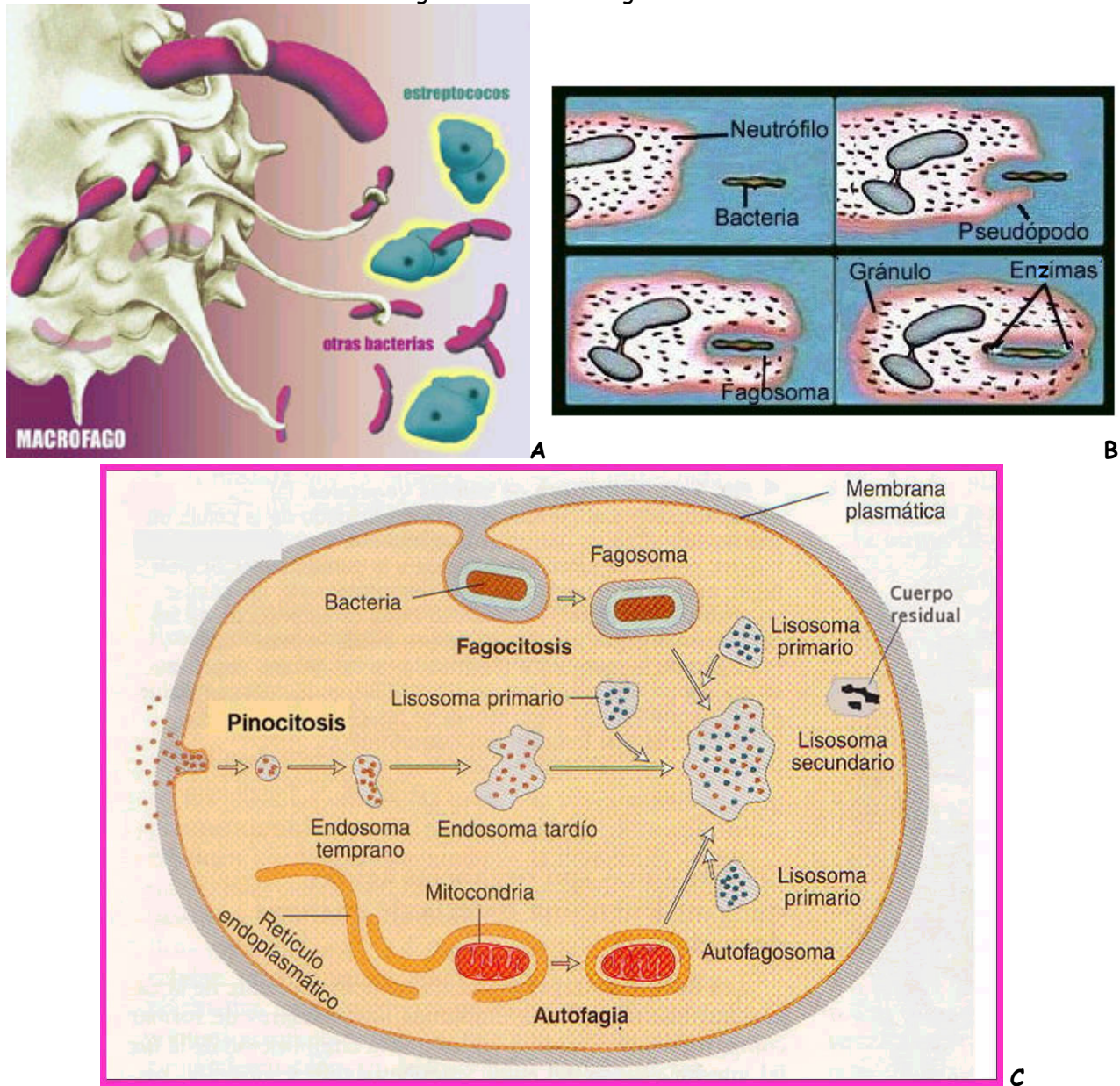


CASCADA DE DESTRUCCIÓN.



Prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT) Esta prueba mide la capacidad bactericida disminuida de los neutrófilos polimorfonucleares. Las células defectuosas no reducen el colorante NBT durante la fagocitosis (2).

Fig 14. Proceso de fagocitosis.



La Autofagia es un proceso del fagocito donde su retículo endoplásmico crea un autofagosoma en su misma mitocondria liberando gránulos para la destrucción de la misma mitocondria y así liberar los gránulos contenidos de la mitocondria que son los gránulos secundarios específicos.

Cuadro 13. Deficiencias de la fagocitosis.

ENFERMEDAD.	ALTERACION
Enfermedad granulomatosa crónica, (EGC).	Falta de enzima NADH oxidasa no se produce H ₂ O ₂ .
Síndrome de Job.	Esta disminuida la capacidad para reducir El NBT.
Deficiencia de glucosa fosfato deshidrogenasa.	Igual que EGC aquí si se cuenta con mieloperoxidasa.
Deficiencia de mieloperoxidasa.	Es defectuosa la muerte intracelular.
Síndrome Chediak-Higashi.	Alterada la muerte intracelular y existen granulos gigantes intracitoplasmaticos.
Enfermedad de leucocito perezoso.	Movimientos lentos e incapacidad para desplazarse posibles defectos en la expresión de receptores quimiotacticos.
Deficiencia del receptor CR3.	Deficiencia en la adhesión de los leucocitos.

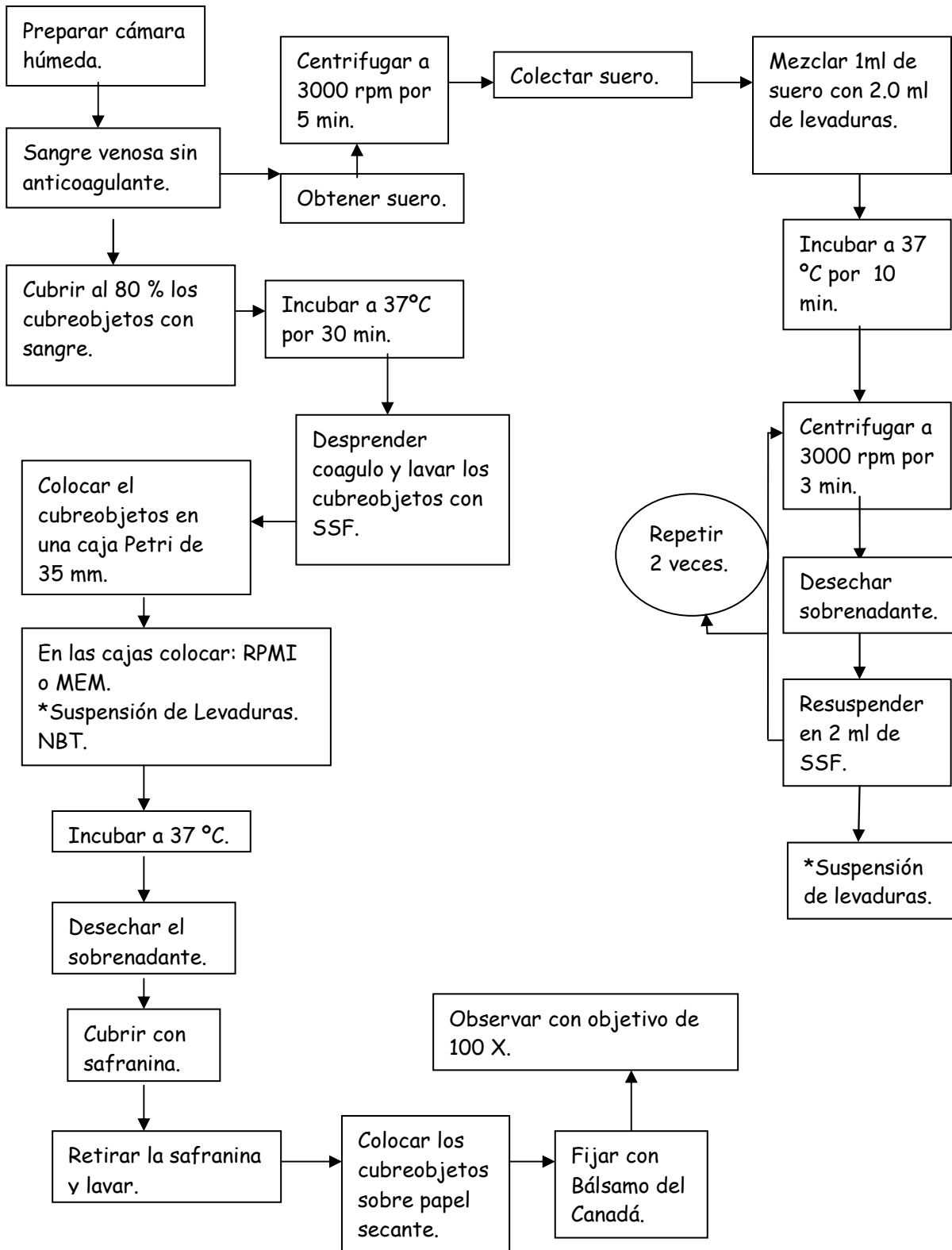
MATERIAL.

Dos cajas Petri grandes.
 Cuatro cajas Petri de 35 mm.
 Pipeta Pasteur.
 Vaso de precipitados de 100 ml.
 Pinzas de disección.
 Dos Tubos de ensaye de 13 x 100.
 Tres pipetas de 1 ml.
 Gradilla.
 Dos portaobjetos.
 Cuatro cubreobjetos.
 Tres aplicadores de madera.

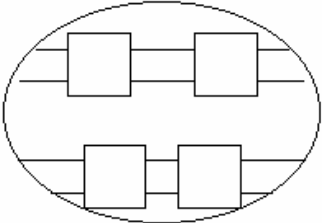
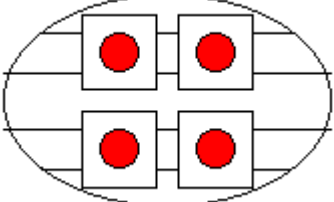
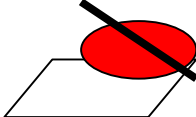
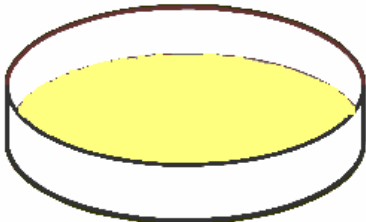
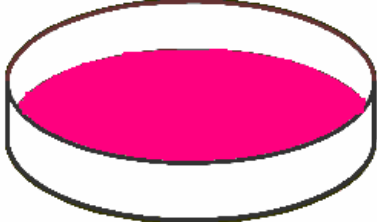
REACTIVOS.

SSF.
 Medio de Cultivo RPMI ó MEM.
 Nitroazul de Tetrazolio al 0.1 en SSF (NBT).
 Safranina al 0.5% en agua destilada.
 Bálsamo del Canadá.

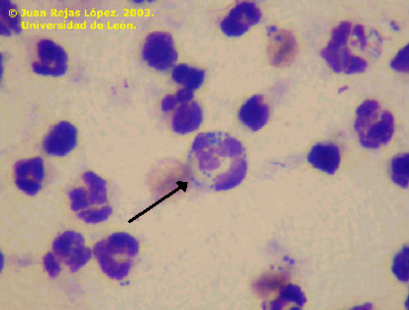


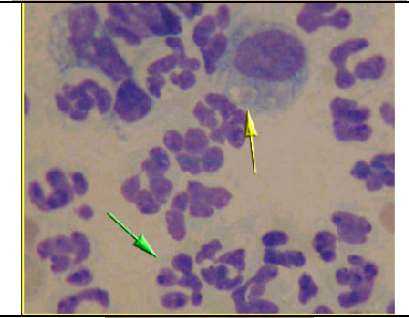

Fig 15. Diagrama de flujo de fagocitosis.



METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ¹.

<ol style="list-style-type: none"> 1. Preparar la cámara húmeda. En una caja Petri se coloca algodón humedecido con SSF a 37 °C, sobre el algodón se colocan dos aplicadores de madera en forma paralela para sostener los cubreobjetos y luego tapar las cajas Petri para conservar la humedad. 2. Obtener 10 ml de sangre venosa sin anticoagulante. 	
<ol style="list-style-type: none"> 3. Tomar una muestra de sangre con pipeta Pasteur y colocar sangre suficiente para cubrir el 75 % ó 80 % de cada cubreobjeto. 4. Incubar los cubreobjetos con las muestras de sangre a 37 °C por 30 min en la cámara húmeda. 	
<ol style="list-style-type: none"> 5. Desprender los coágulos de los cubreobjetos, con cuidado, con aplicadores de madera por la orilla. 	
<ol style="list-style-type: none"> 6. Lavar los cubreobjetos con SSF a 37 °C y eliminar los restos de fibrina con aplicadores de madera. 7. Colocar los cubreobjetos en una caja Petri de 35 mm que contenga 1.5 ml de RPMI ó MEM adicionar en las cajas Petri 0.5 ml de suspensión de levaduras opsonizadas y 0.5 ml de NBT. 8. Incubar las cajas a 37 °C por 40 min. 9. Desechar el sobrenadante de las cajas. 	
<ol style="list-style-type: none"> 10. Lavar 2 veces con SSF a 37 °C. 11. Cubrir las cajas con safranina por 10 min. 12. Lavar con agua en abundancia. 13. Colocar los cubreobjetos sobre el papel secante. 14. Montar, con Bálsamo del Canadá, 2 cubreobjetos en cada portaobjeto. 15. Dejar secar el Bálsamo. 16. Observar y contar con objetivo de 100 X. 	

17. Se hace un conteo de:

A) Células que fagocitan.	 <p>© Juan Rejas López. 2003. Universidad de León.</p>
B) Células que no fagocitan	
C) Levaduras fagocitadas.	 <p>© Juan Rejas López. 2003. Universidad de León.</p>
D) Células que fagocitan y reducen el NBT.	
E) Células que no fagocitan y no reducen el NBT.	

OPSONIZACIÓN (1).



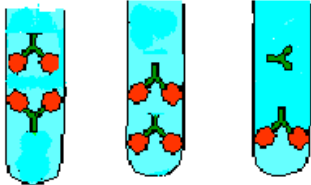
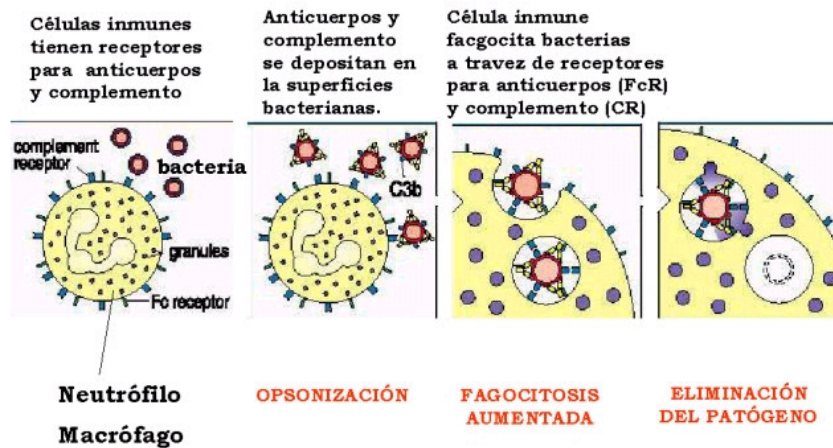
<p>A) El resto de la sangre se va a emplear para la preparación de la suspensión de levaduras. B) Incubar la sangre a 37 °C durante 30 min para obtener suero.</p>		
<p>C) Se colecta el suero. D) Se prepara una mezcla de 1 ml de suero con 2 ml de solución de levaduras. E) La mezcla se incuba a 37 °C por 10 min. F) Se pone a centrifugar a 3000 rpm por 3 min. G) Se desecha el sobrenadante. H) Se resuspende la mezcla en 2 ml de SSF. I) Se repiten los pasos F, G y H 2 veces para que quede bien lavada la suspensión de levaduras.</p>		
<p>El suero contiene anticuerpos y factor del complemento para favorecer la fagocitosis.</p>		

Fig 16. Efecto de la opsonización en la fagocitosis.

Fagocitosis de bacterias por macrófagos y neutrófilos es potenciada por anticuerpos y complemento: OPSONIZACIÓN.



PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ¹.

1. Respetar tiempos y temperaturas de la técnica de la cámara húmeda ya que de otra forma se alteran los resultados.
2. La sangre venosa se tiene que trabajar inmediatamente si no se coagula en el tubo.
3. Hay que trabajar los cubreobjetos después de la incubación tomarlos con las pinzas de disección para no tocar el coagulo porque se puede romper sobre el cubreobjetos se estropea el trabajo en dado caso se tendría que repetir.
4. Al desprender el coagulo es consumo cuidado y por las orillas del cubreobjetos de manera de quitarlo en forma muy delicada.
5. Manipular los cobreobjrtos con cuidado con las pinzas y colocarlos en las cajas Petri de 35 mm.
6. No perder de vista la cara donde se encuentran las células al sumergir los cubreobjetos y no perder de vista la cara del cubreobjetos donde se encuentran las células fagocíticas en fresco.
7. Después del tratamiento de las células fagocíticas en las cajas de 35 mm y su coloración con safranina lavar con cuidado para no dañar las células.

Cuadro 14. Riesgo de los reactivos de la práctica No 3.

	Safranina	Nitro Azul de Tetrazolio	Cloruro de Sodio al 0.9% (SSF)
SALUD	0	1	1
INFLAMABILIDAD	0	1	0
REACTIVIDAD	0	1	0
CONTACTO	1	1	1
EPP	A	A	A
ALMACENAJE	VERDE	VERDE	VERDE

RESULTADOS.

La cuenta mínima de células fagocíticas debe de ser como mínimo 200 células para determinar porcentajes.

Cuadro 15. Tabla de células fagocitarias y reductoras del NBT.

A Células que fagocitan	B Células que no fagocitan	C Levaduras fagocitadas	D Células que reducen el NBT	E Células que no reducen el NBT

Calcular

Porcentaje de fagocitosis
 $[(A/A + B)] \times 100$

Indice Fagocitico
 C/A

Porcentaje de reducción del NBT
 $[(D/D + E)] \times 100$

BIBLIOGRAFÍA.

1. AGUILAR TORRENTA FAVIOLA 2001. Manual del Curso Practico de Inmunología, 1ª edición, Editorial ENCB IPN, México DF, 204 pp.
2. GRADWOHL. 1986. Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico, Volumen I, 8ª edición, Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1110 pp.
3. ROITT, IVAN. 2000. Inmunología, 5ª edición. Harcourt ediciones. Madrid, España. 423 pp.

PRÁCTICA No 4

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN Y FLOCULACIÓN.

Objetivo:

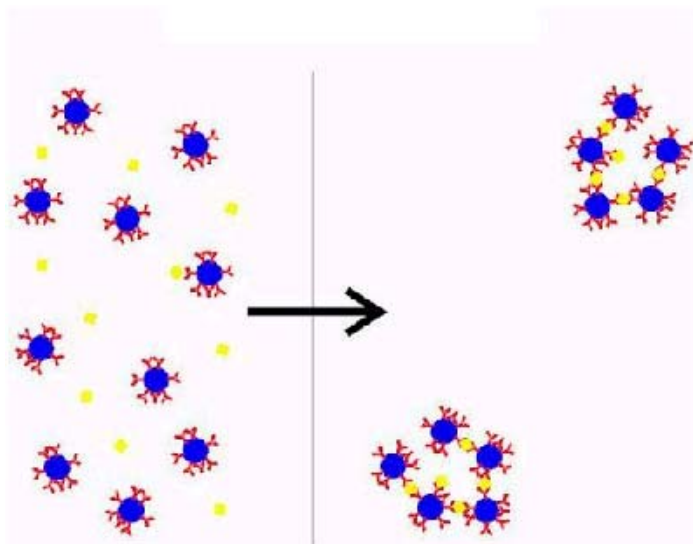
Para evaluar la inmunidad humoral se medirá la presencia de anticuerpos como indicativo de una infección en curso (IgM) y una infección pasada una de las variantes son las pruebas serológicas con las cuales se va a identificar la presencia de anticuerpos séricos que reconocen a un antígeno o patógeno.

INTRODUCCIÓN.

AGLUTINACIÓN.

Cuando un anticuerpo es puesto en contacto con su antígeno específico, si este se encuentra en estado particulado (hematíes, bacterias, células), se forman grumos de tamaño macroscópico. La formación de agregados en una solución o suspensión es afectada por las fuerzas electrostáticas, que es necesario controlar para obtener buenos resultados. Dado que las células de la mayoría de las bacterias poseen carga negativa superficial, tienden a repelerse. Se han desarrollado diversos procedimientos serológicos para la detección de anticuerpos mediante la aglutinación de un portador artificial que lleva el antígeno fijado sobre su superficie. Los antígenos de *Streptococcus*, *Cryptococcus neoformans*, agentes de meningitis bacteriana, entre otros, pueden ser detectados si se emplean sistemas de aglutinación de partículas de látex. El tamaño del portador permite la visualización de la reacción y la naturaleza artificial del sistema permite que el antígeno unido a la superficie de la partícula sea extremadamente específico (3).

Fig 17. Aglutinación en látex.



FLOCULACIÓN.

En contraste con los agregados formados por la interacción de antígenos particulados con sus anticuerpos homólogos, la reacción de antígenos solubles con sus anticuerpos provoca la formación de un tamaño de precipitado, una concentración de partículas pequeñas, usualmente visible sólo cuando el producto precipitado se retiene en un espacio definido dentro de una matriz. Aunque la prueba de precipitación no se emplea en forma directa para determinaciones serológicas, dos variantes han sido ampliamente usadas. En las pruebas de floculación el producto final precipitado forma agregados visibles microscópicamente o macroscópicamente, la prueba de VDRL es la reacción de floculación más usada. Los pacientes infectados

con treponemas patógenos, por lo general *Treponema pallidum*, agente etiológico de la sífilis, desarrollan una proteína semejante a un anticuerpo denominada reagina que se fija al antígeno empleando en la prueba, partículas de colesterol cubiertas con cardiolipina y lecitina, provocando su floculación. En si la reacción se manifiesta en forma de grumos o abultamientos (3).

INHIBICIÓN DE LA AGLUTINACIÓN.

Se detecta la neutralización de antígeno y anticuerpo por demostración de la inhibición de la reacción, generalmente cualquier reacción entre un antígeno y su anticuerpo homólogo puede inhibirse mediante un procedimiento, exponer el antisuero al antígeno apropiado. Cuando el antisuero neutralizado se agrega a su antígeno homólogo (o el antígeno neutralizado se mezcla con su antisuero homólogo), no hay ninguna reacción (3).

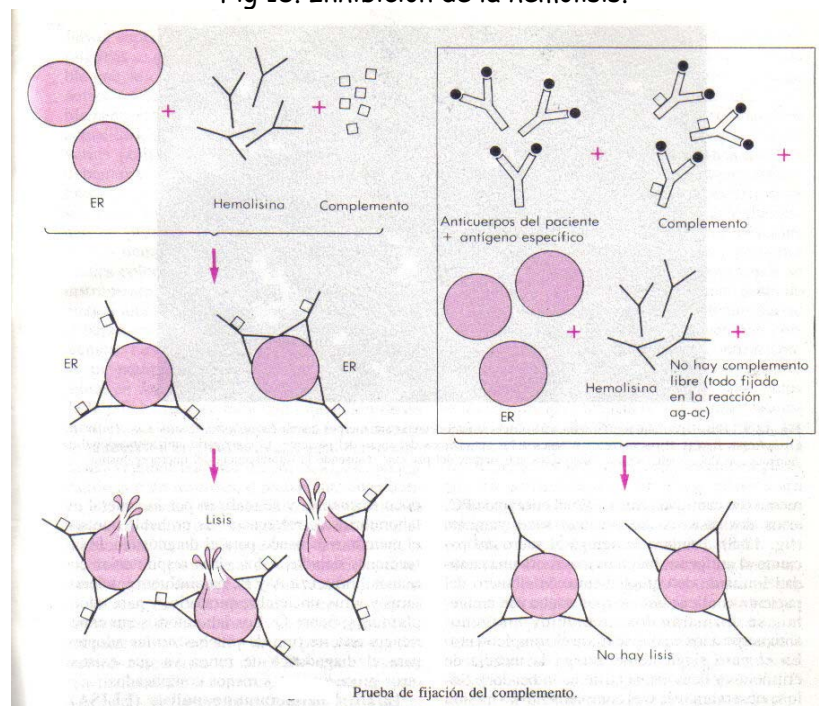
HEMÓLISIS.

Es la lisis o traumatismo de los eritrocitos y son disueltos liberando hemoglobina es provocada por anticuerpos o infección con bacterias causen la lisis de los eritrocitos también a su vez por enfermedades de anemias hemolíticas (3).

INHIBICIÓN DE LA HEMÓLISIS.

Indica el diagnóstico para encontrar anticuerpos de un paciente mediante la prueba de fijación al complemento consta colocando suero del paciente al antígeno, luego se incorpora una cantidad limitante de complemento de cobayo, si el suero contiene anticuerpos contra ese antígeno se formaran complejos antígeno-anticuerpo a los cuales se fijara el complemento de cobayo luego se agregan eritrocitos de oveja y hemolisina de eritrocitos, como el complemento fue fijado al complejo antígeno-anticuerpo y no se fija al anticuerpo hemolisina se inhibe la hemólisis de eritrocitos la prueba es positiva, en caso contrario, si no hay anticuerpos de paciente en el suero entonces el complemento se fija a la hemolisina por lo tanto la hemolisina-complemento causara la hemólisis de los eritrocitos y la prueba es negativa (2,3).

Fig 18. Inhibición de la hemólisis.



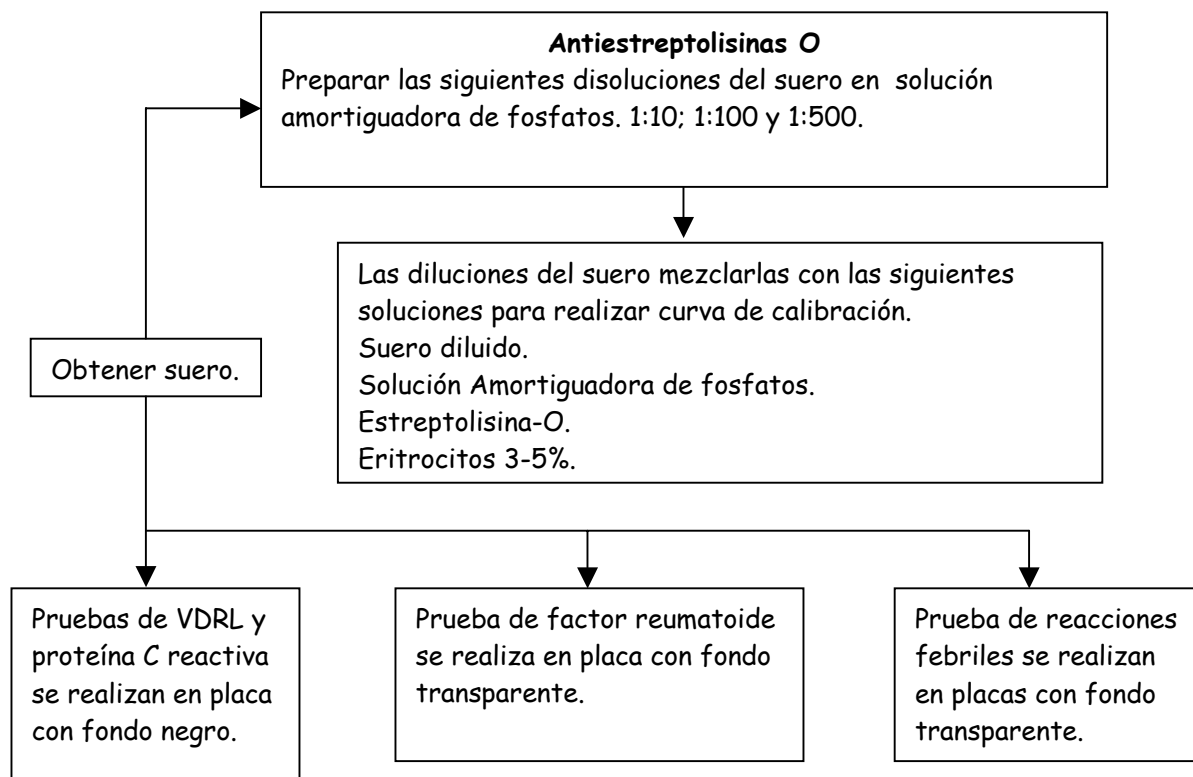
MATERIAL.

2 placas con fondo negro.
2 placas con fondo transparente.
6 aplicadores de madera.
13 tubos de ensaye de 13 x 100.
Centrifuga.
3 pipetas graduadas.
Baño María.

REACTIVOS.

Equipo de diagnóstico para VDRL.
Equipo de diagnóstico para Factor Reumatoide.
Equipo de diagnóstico para Reacciones Febriles.
Equipo de diagnóstico para antiestreptolisinas.
Kit de estreptolisina-O liofilizada para antiestreptolisinas.
Solución Amortiguadora de Fosfatos.
SSF.

Fig 19. Diagrama de flujo de pruebas de aglutinación y floculación.



METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ^{1,2,3,4}.

Obtener 10 ml de sangre venosa sin anticoagulante.

I. Antiestreptolisina-O.

Preparar las siguientes diluciones:

Dilución 1:10 (0.2ml de suero + 1.8 ml de solución amortiguadora de fosfatos).

Dilución 1:100 (0.5 ml de dilución 1:10 + 4.5 ml de solución amortiguadora de fosfatos).

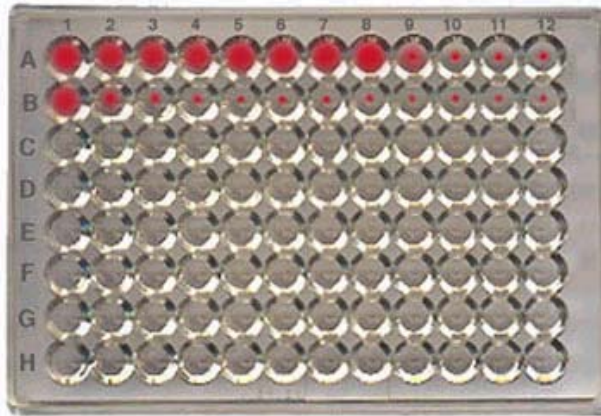
Dilución 1:500 (1ml de dilución 1:100 + 4ml solución amortiguadora de fosfatos)

Proceder de la siguiente forma:

Cuadro 16. Diluciones de ASO.

Dilución de Suero	1:10	1:100					1:500					Controles	
Tubo No	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Suero Diluido (ml)	0.2	1	0.8	0.6	0.4	0.3	1	0.8	0.6	0.4	0.2	0	0
Solución amortiguadora de fosfatos (ml)	0.8	0	0.02	0.4	0.6	0.7	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.5	1
Estreptolisina-O(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5
<i>Mezclar y mantener en baño María a 37 °C por 15 min.</i>													
Eritrocitos 3-5%(ml)	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
<i>Mezclar agitando ligeramente y mantener en baño María a 37 °C durante 15 min, agitar nuevamente y continuar en baño María durante 30 min más. Centrifugar 3 min a 1500 rpm y leer.</i>													
Unidades Todd/ml	50	100	125	166	250	333	500	625	833	1250	2500	(-)	(+)

Fig 20. Placa con diluciones de eritrocitos para la prueba de Antiestreptolisinas-O.



II. Factor Reumatoide.

Se utiliza una placa con fondo transparente.

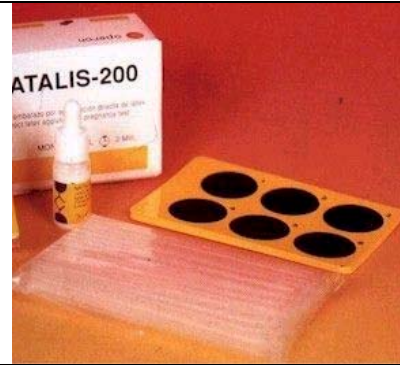
1. Primer cuadro se coloca una gota de control negativo.
2. Segundo cuadro se coloca una gota de suero.
3. Tercer cuadro una gota de control positivo.
4. En los 3 cuadros se agrega una gota de reactivo de látex. Mezclar con aplicador de madera y rotar la placa.



III. VDRL y Proteína C Reactiva.

Se utilizan placas con fondo negro, la placa tiene 3 círculos negros.

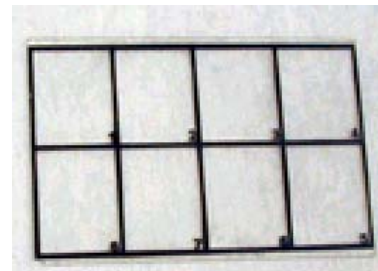
1. Primer círculo se coloca una gota del control negativo.
2. Segundo círculo se coloca una gota de suero.
3. Tercer círculo se coloca una gota del control positivo.



IV. Pruebas de Reacciones Febriles.

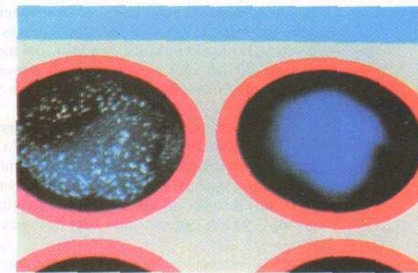
Se utilizan placas con fondo transparente, la placa tiene 8 cuadros transparentes.

1. Primer cuadro se coloca una gota de control negativo y una gota de uno de los 6 antígenos.
2. Segundo cuadro se coloca una gota de control positivo y una gota de uno de los 6 antígenos.
3. Poner del 3 al 8 una gota de cada antígeno y una gota de suero, mezclar con aplicador de madera, y rotar los cuadros.



Se debe observar de esta forma la aglutinación.

En las pruebas de proteína C reactiva, factor reumatoide.



En las reacciones febriles.

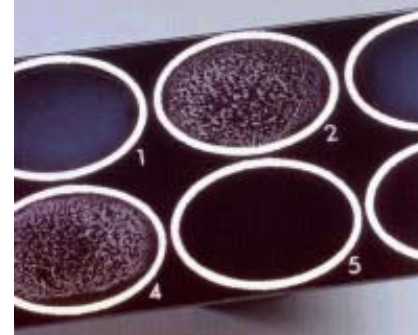


Fig 21. Esquema de aglutinación en látex.

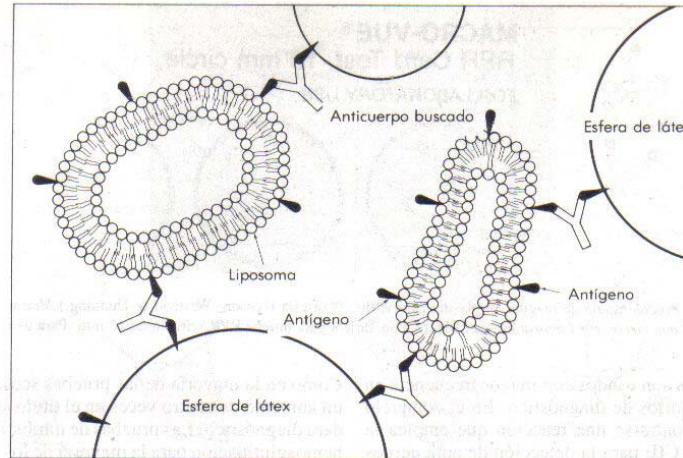
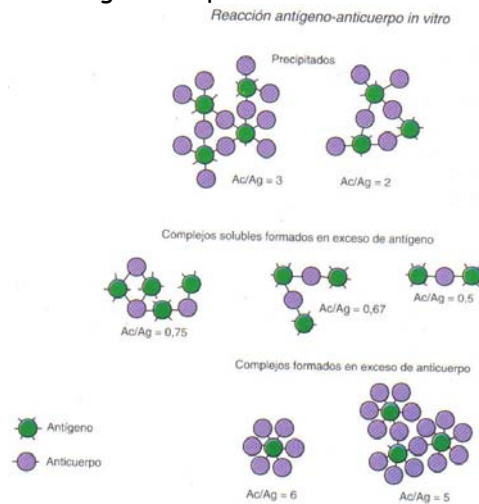


Fig 22. Esquema de floculación.



PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ¹.

1. Prueba de antiestreptolisina-O.
 - a) realizar correctamente las diluciones.
 - b) tener cuidado en el lavado y tratamiento de los eritrocitos para que no sufran hemólisis.
 - c) mantener la temperatura a 37 °C para evitar daños a los eritrocitos y que se de un falso negativo.
2. Identificar y rotular bien las placas cuales:
 - a) el control negativo.
 - b) si hay reacción de aglutinación.
 - c) el control positivo.

No confundirse por que si no se da un mal diagnóstico y se tendrá que repetir toda la técnica.
3. Diferenciar, según sea el caso; si la reacción es de aglutinación ó floculación.
4. En caso de duda para identificar la aglutinación recurrir a la observación con microscopio. (10X).

Cuadro 17. Riesgo de los reactivos de la práctica No 4.

	Solución Amortiguadora de Fosfatos	Cloruro de Sodio al 0.9% (SSF)
SALUD	2	1
INFLAMABILIDAD	0	0
REACTIVIDAD	1	0
CONTACTO	2	1
EPP	A	A
ALMACENAJE	VERDE	VERDE

RESULTADOS.

ANTIESTREPTOLISINA-O.

El título de la muestra se expresa mediante la inversa de la mayor dilución en la cual se observa ausencia total de hemólisis.

El tubo 12 (control eritrocitario) no deberá presentar hemólisis mientras que el tubo 13 (control de estreptolisina-O) deberá presentar hemólisis completa.

Valores de Referencia.

Normalmente pueden existir en suero hasta 200 unidades de antiestreptolisina-O, títulos superiores son indicativos de un proceso infeccioso por estreptococo β -hemolítico de grupo A, según en el instructivo de Laboratorios Winner.

Las pruebas de aglutinación y floculación cualitativas pueden volverse semicuantitativas si se realizan diluciones dobles del suero del paciente y obtener el título con la máxima dilución en la que se presenta el fenómeno.

Cuadro 18. Reporte de los resultados de pruebas de aglutinación y floculación.

EQUIPO	VDRL	PCR	TÍFICO O	TÍFICO H	PARATÍFICO A	PARATÍFICO B	F Huddleson	PROTEUS	F R

BIBLIOGRAFÍA.

1. AGUILAR TORRENTA FAVIOLA 2001. Manual del Curso Practico de Inmunología, 1ª edición, Editorial ENCB IPN, México DF, 204 pp.
2. BAILEY, SCOTT. 1988. Diagnostico Microbiológico, 7ª edición, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires Argentina. 877pp.
3. KONEMAN, ELME W. 1991. Diagnóstico Microbiológico. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana México, D.F. 553 pp.
4. WIENER LAB . 2000. Instructivo de O-Estreptolisina liofilizada para Diagnostico de estreptococo β hemolítico.

PRÁCTICA No 5 PRECIPITACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS.

Objetivos:

La purificación de inmunoglobulinas se hace con fines diagnósticos (suero de Coombs) y con fines terapéuticos. Para transferencia de inmunidad pasiva artificial en casos de inmunodeficiencias y como antídoto para toxinas de animales venenosos en esta práctica las inmunoglobulinas se purificarán por el método de *salting-out* con sulfato de amonio luego se purificarán por método de diálisis para liberarlas de sales.

INTRODUCCIÓN.

Las inmunoglobulinas se encuentran en muy pequeñas cantidades, por lo que para obtenerlas se requieren grandes cantidades de suero.

Método de precipitado con sales: la solubilidad de la mayoría de las proteínas disminuye frente a elevadas concentraciones de sales, este efecto llamado desalado (*salting-out*), dependen de la solubilidad, respecto a la concentración salina de una u otra proteína. Por lo tanto el salado puede utilizarse para el fraccionamiento de las proteínas. El salado también resulta útil para concentrar disoluciones diluidas de proteínas. La solubilidad de una proteína depende, entre otras cosas, de la concentración de sales en la solución. A concentraciones bajas, la presencia de sal estabiliza los diferentes grupos funcionales presentes en una molécula de proteína, atrayendo la proteína así en la solución y reforzando la solubilidad de la proteína. Esto normalmente es conocido como salación. Sin embargo, cuando la concentración de sal aumenta, un punto de solubilidad máxima se alcanza. El aumentar la concentración de sales implica que hay cada vez menos agua disponible para que la proteína se solubilice. La disminución de la solvatación dispersa las moléculas y expone las áreas hidrófobas de la estructura proteínica que entonces actúan recíprocamente para dar a agregados que precipitan entre sí. Se han empleado diversas sales para efectuar la separación y purificación de las proteínas a través de desalación. De estas sales, el sulfato del amonio ha sido el reactivo más ampliamente usado porque puede obtenerse con alta pureza y es relativamente barato. Ya que las enzimas son proteínas, la purificación de una enzima puede llevarse a cabo siguiendo el mismo tipo de procedimientos como aquellos para una proteína, sólo que debe prestarse a la consideración la disminución constante de actividad debido a la desnaturalización por las condiciones adversas (2).

Fig 23. Técnica de desalación.

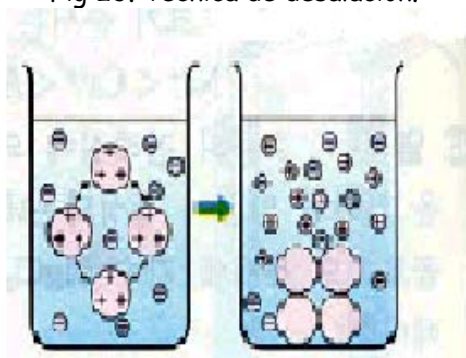
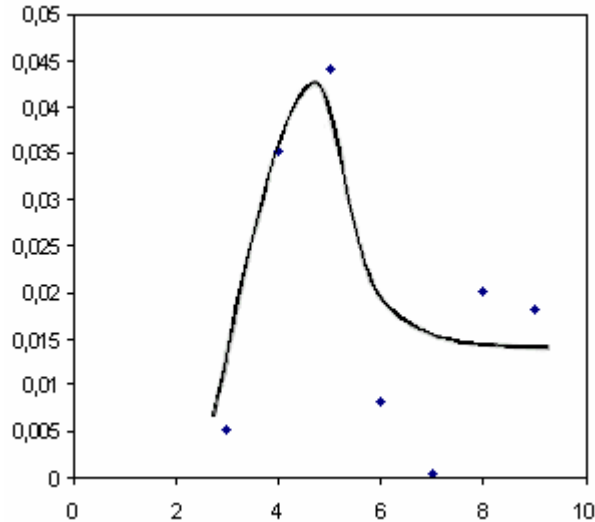


Fig 24. Gráfica que indica la separación de una proteína en su punto isoelectrico.



Diálisis: otro método para separar proteínas es por medio de una membrana semipermeable, tal como una membrana porosa de celulosa, las moléculas con dimensiones significativamente mayores que el diámetro del poro quedan retenidas dentro del saco de diálisis al tiempo que las moléculas y los iones menores atraviesan los poros de la membrana y aparecen en el dializado fuera del saco de diálisis (2).

Electroforesis: las proteínas pueden separarse muy bien, según sus masas moleculares, utilizando electroforesis sobre gel de poliacrilamida en condiciones neutras, la mezcla de proteínas se disuelve primero en un medio con dodecilsulfato de sodio (SDS), un detergente aniónico capaz de romper casi todas las interacciones no covalentes en las proteínas nativas, también se añade mercaptoetanol o ditiotreitól para reducir los puentes disulfuro. Los aniones de SDS se unen a la cadena principal a razón de un SDS por cada dos aminoácidos, lo que da al complejo SDS-proteína desnaturalizada da una carga negativa. Al ser la carga negativa, adquirida por fijación de SDS, los complejos SDS-proteína se someten entonces a electroforesis sobre gel de poliacrilamida. La dirección de la electroforesis es vertical descendente (2),

Cromatografía de filtración por gel: la muestra se aplica en lo alto de una columna rellena de esferas porosas hechas de un polímero insoluble pero muy hidratado, tal como el dextran o la agarosa o bien la poliacrilamida. El sephadex, la sepharosa y el Bio-gel, se utilizan habitualmente esferas de un diámetro medio de 100 μ m. Las moléculas menores pueden entrar en las esferas, pero las mayores no. En consecuencia las moléculas grandes fluyen con más rapidez a través de la columna y salen antes por que disponen de un volumen accesible menor (2).

Cromatografía por intercambio iónico: las proteínas pueden también separarse en función de su carga eléctrica, si una proteína tiene un pH de 7, una carga positiva, normalmente se unirá a una columna rellena de esferas conteniendo grupos carboxilato, mientras que una proteína cargada negativamente no lo hará. Una proteína con carga positiva unida a la columna, puede ser eluida aumentando la concentración de cloruro de sodio u otra sal en el amortiguador eluyente, los cationes de sodio compiten con los grupos positivos de la proteína en su capacidad de unirse a la columna. Las proteínas de baja densidad de cargas positivas se eluirán primero, seguidas por las de mayor densidad de cargas. Para separar las proteínas con carga negativa se utilizan columnas con relleno cargado positivamente (2).

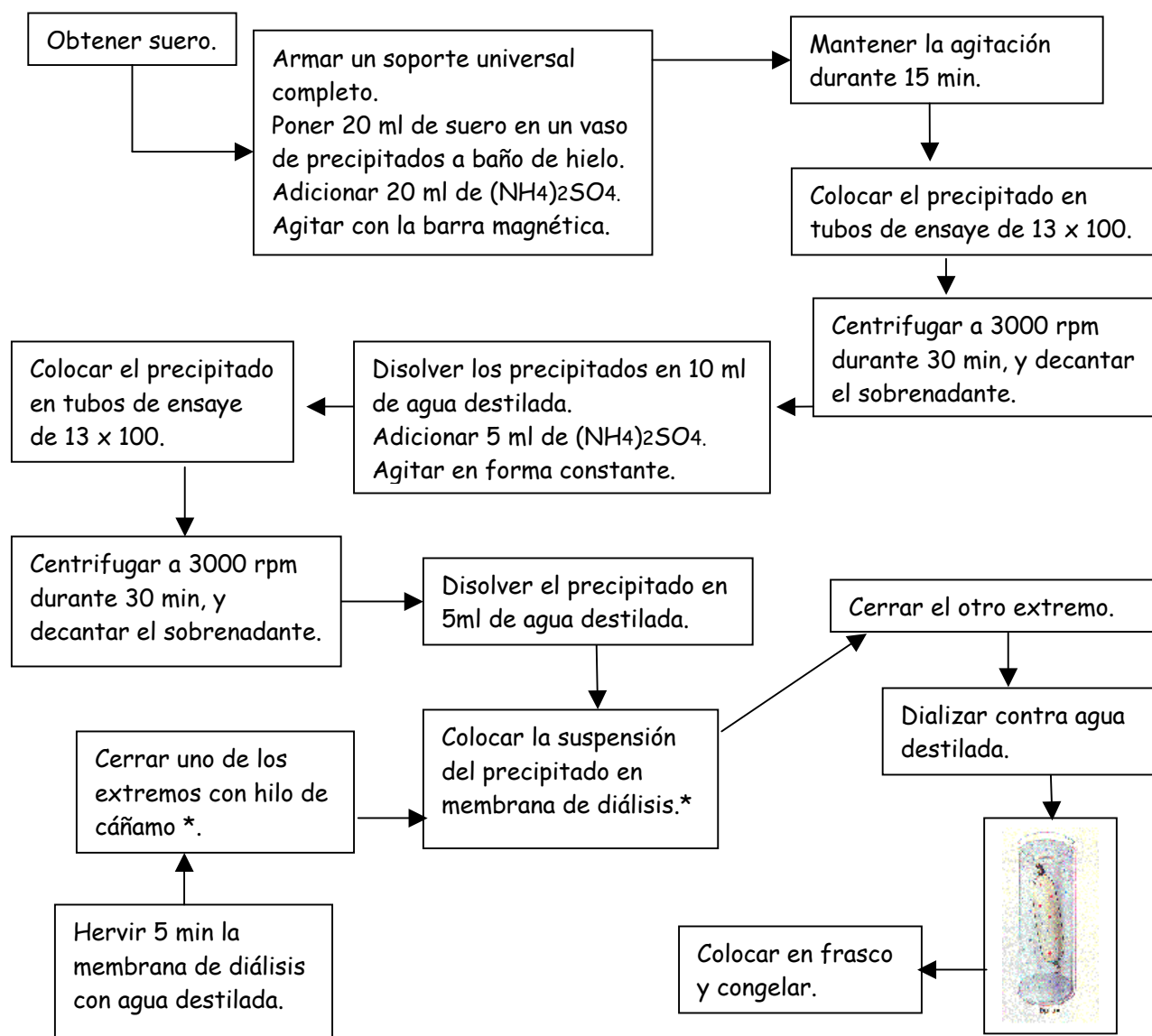
MATERIAL.

1 Bureta graduada de 50 ml.
1 Vaso de precipitados de 500 ml.
2 Vasos de precipitados de 100 ml.
1 Recipiente de plástico.
1 Agitador magnético.
1 Barra magnética.
1 Gradilla.
10 Tubos de ensaye de 13 x 100.
1 Pipeta Pasteur.
Soporte universal.
Pinzas para bureta.
Hilo de cáñamo.
Papel de celulosa.

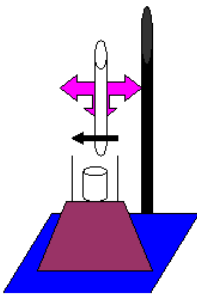

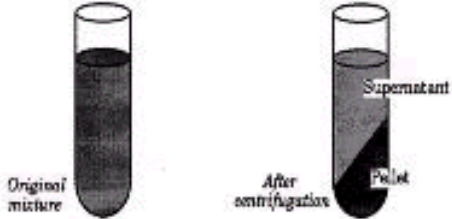

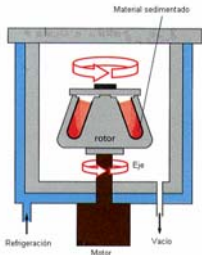
REACTIVOS.

1 Litro de solución saturada de Sulfato de amonio $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.
1 Litro de Agua destilada.
Suero de paciente.

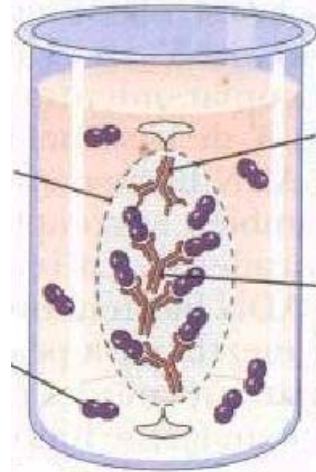
Fig 25. Diagrama de flujo de precipitación de inmunoglobulinas.



METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA^{1,2}.

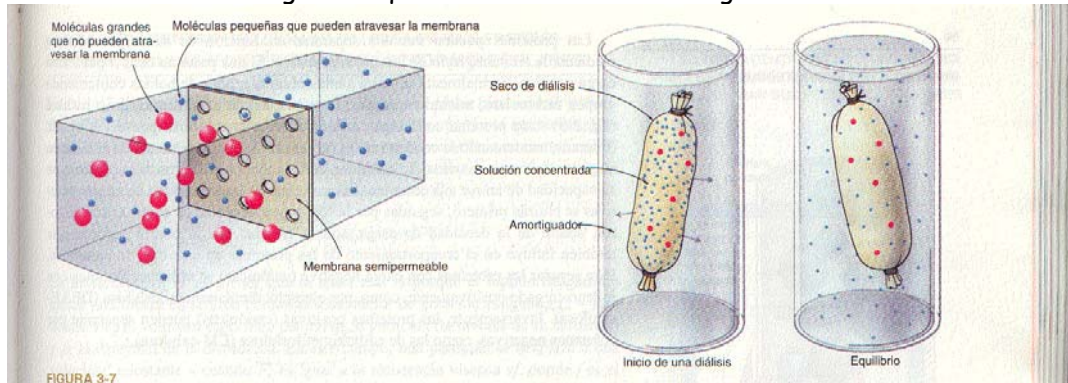
<ol style="list-style-type: none"> 1. Obtener suero del paciente. 2. Armar un soporte universal completo. <ol style="list-style-type: none"> a. En el vaso de precipitados de 100 ml colocar 20 ml de suero. b. Poner el vaso de precipitados en baño de hielo. c. En la bureta de 50 ml colocar 20 ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. 	
<ol style="list-style-type: none"> 3. Comenzar la precipitación con solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 100% en 15 min y al mismo tiempo poner a agitar el suero con la barra magnética. 4. Mantener la agitación otros 15 min. 	
<ol style="list-style-type: none"> 5. Vertir el precipitado en tubos de ensaye de 13 x 100. 6. Poner a centrifugar la suspensión a 3000 rpm durante 30 min. 7. Decantar el sobrenadante. 	
<ol style="list-style-type: none"> 8. Disolver los precipitados en 10 ml de agua destilada. 9. Volver a precipitar. <ol style="list-style-type: none"> a. Colocar los 10 ml en un vaso de precipitado de 100 ml. b. Adicionar 5 ml de solución saturada de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. c. Repetir de forma similar la precipitación. d. Obtener un volumen de 15 ml. 10. Mantener la agitación otros 15 min. 	
<ol style="list-style-type: none"> 11. Vertir el precipitado en un tubo de ensayo. 12. Volver a centrifugar a 3000 rpm durante 30 min. 	

13. Preparar bolsa de diálisis simultáneamente
 - a. Hervir 5 min la membrana de diálisis con agua destilada.
 - b. Cerrar uno de los extremos con hilo de cáñamo.
14. Decantar el sobrenadante.
15. Disolver el precipitado en 5 ml de agua destilada.
16. Colocar en la membrana de diálisis con sumo cuidado.
17. Cerrar el otro extremo de la bolsa de la diálisis.
18. Dializar contra agua destilada por 96 hrs.



19. Colocar el dializado en un frasco y congelar para usar en prácticas posteriores.

Fig 26. Esquema de diálisis de inmunoglobulinas.



PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ¹.

1. Medir en forma cuidadosa y con la cantidad dicha de 20 ml de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ si se excede, se vuelve a solubilizar las inmunoglobulinas entonces se tendrá que repetir el procedimiento.
2. Agregar lentamente el precipitado con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ para lograr la homogeneización y haya una precipitación de inmunoglobulinas.
3. La segunda precipitación se realiza de la misma manera que la primera en forma muy cuidadosa siempre en baño de hielo.
4. Preparar bien la bolsa de diálisis, al manipular la membrana no tocar directamente con las manos si no usar guantes y tocar solo los extremos laterales.
5. Calentar la membrana previamente para retirar la cera que recubre la membrana de diálisis y pueda permitir el paso de moléculas como sales al momento de realizar la diálisis no haya paso de moléculas grandes para que se de una adecuada purificación de inmunoglobulinas.
6. Cerrar bien con el hilo de cáñamo un extremo de la membrana y probarlo con agua destilada para ver si no hay fuga.
7. Cerrar bien el otro extremo con el hilo y probar invirtiendo la bolsa donde se cerró por último para ver sino hay fuga.
8. Dializar con una velocidad adecuada por que si se coloca en forma veloz puede romperse la bolsa de diálisis y se pierde el precipitado de inmunoglobulinas.

Cuadro 19. Riesgo de los reactivos de la práctica No 5.

	Sulfato de amonio
SALUD	2
INFLAMABILIDAD	0
REACTIVIDAD	1
CONTACTO	1
EPP	A
ALMACENAJE	Verde

RESULTADOS.

Se reportará el volumen obtenido de la bolsa de diálisis del contenido del precipitado de inmunoglobulinas. Este precipitado de inmunoglobulinas se utilizara en las prácticas posteriores, que son:

- Cualificación de proteínas.
- Doble difusión.

BIBLIOGRAFÍA.

1. AGUILAR TORRENTA FAVIOLA 2001. Manual del Curso Practico de Inmunología, 1ª edición, Editorial ENCB IPN, México DF, 204 pp.
2. STRYER LUBERT 1995. Bioquímica, Tomo 1, 4ª edición, Editorial Reverte, S.A. Barcelona España, 438 pp.

PRÁCTICA No 6

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS.

Objetivo:

Como parte del control de calidad de un antisuero se debe establecer la concentración de inmunoglobulinas, por lo que se cuantificará por el método de Lowry y se realiza una curva patrón con diferentes concentraciones de proteínas que nos servirá para lectura de color e interpolar el valor de densidad óptica y obtener la concentración de inmunoglobulinas.

INTRODUCCIÓN.

Método de Bradford: consiste en la formación de un compuesto de absorción de coloración azul entre los residuos de aminoácidos básicos de las proteínas y el colorante Azul Coomassie. Absorbe luz a 595 nm. El rango de determinación de proteína es de 1-10 mg/ml (ensayo micro) y de 0.5 -1.4 mg/ml (ensayo estándar). La intensidad de absorción depende del contenido de aminoácidos básicos y aromáticos.

Reacciones de color de proteínas y aminoácidos: por su estructura peptídica y por la presencia de diferentes grupos de aminoácidos en sus moléculas, las proteínas reaccionan con diversos agentes los cuales forman productos coloreados (2).

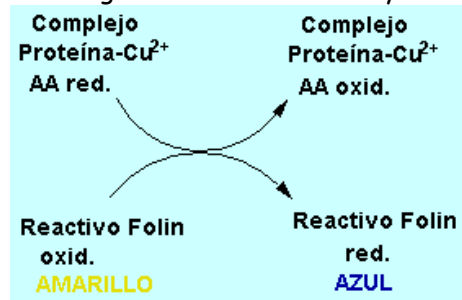
Reacción de ninhidrina: la ninhidrina reacciona con α aminoácidos libres y con proteínas, proteosas, peptonas y péptidos, con formación de color azul. Esta prueba es la más general y una de las más sensibles que se conocen para la identificación cualitativa de proteínas y de sus productos hidrolíticos (2).

Reacción de Biuret: si se trata una solución de Biuret, fuertemente alcalina, con solución de sulfato de cobre muy diluida, se obtiene color violeta. Esta reacción es propia de las sustancias que contienen 2 grupos CONH_2 unidos directamente o por medio de un átomo de carbono o de nitrógeno. Los compuestos que contienen $-\text{CH}_2\text{NH}_2-\text{C}(\text{NH})\text{NH}_2$ y $-\text{CSNH}_2$ en vez de grupos $-\text{CONH}_2$ dan también reacción positiva. La reacción del Biuret se debe a coordinación de iones cúpricos con los pares de electrones sin compartir del nitrógeno del péptido y del oxígeno del agua, con formación complejo púrpura (2).

Reacción xantoproteica: la adición de ácido nítrico concentrado a soluciones de proteínas causa en general la formación de un precipitado blanco que se vuelve amarillo al calentarlo adquiere color anaranjado al alcalinizar la solución. El color amarillo se debe a la nitración de los anillos de fenilo presentes en tirosina, fenilalanina y triptófano con producción de nitrocompuestos de color amarillo, que se vuelven anaranjados por adición de álcalis (formación de sales) (2).

Método de Lowry: este método se refiere para el análisis de proteínas se basa en la combinación del reactivo de Biuret y reducción del reactivo ácido fosfomolibdotúngstico con presencia de tirosina y triptófano de aminoácidos presentes en una proteína con objeto de examen el color final es azul. Este método es rápido y sensible (10 de 20 veces más sensible que la absorción ultravioleta, 100 veces más sensible que la reacción de Biuret sola). Esta técnica es la que se utilizara en la práctica para cuantificar la concentración de inmunoglobulinas (2).

Fig 27. Reacción de Lowry.



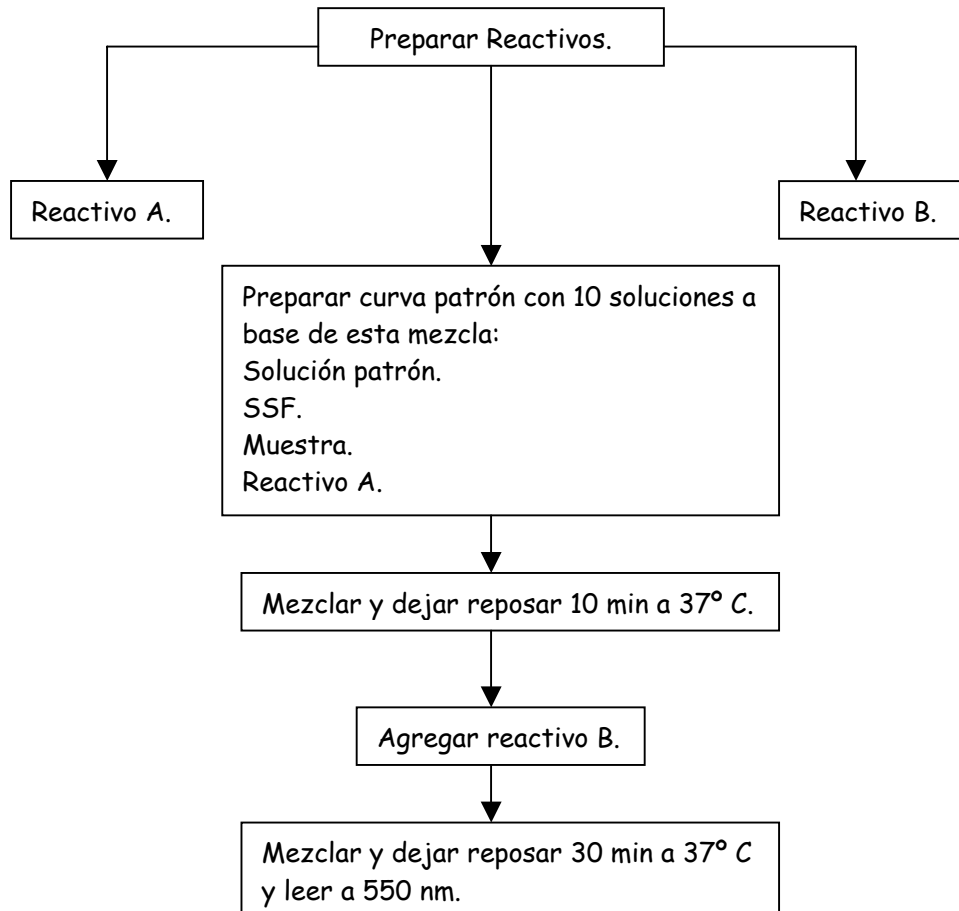
MATERIAL.

- 1 gradilla.
- 10 tubos de ensayo de 13 x 100.
- 1 pipeta de 2 ml.
- 2 pipetas de 1 ml.
- Espectrofotómetro con 2 celdas.
- 1 matraz aforado de 100 ml.
- 1 vaso de precipitados de 100 ml.

REACTIVOS.

- Sulfato de cobre pentahidratado CuSO₄•5H₂O al 1%.
- Tartrato de sodio y potasio al 2%.
- Carbonato de sodio al 2% en NaOH 0.1 N.
- Patrón de albúmina 1mg/ml en SSF.
- Reactivo de fenol al 2 N.
- SSF.

Fig 28. Diagrama de flujo de la cuantificación de Lowry.



METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA¹.

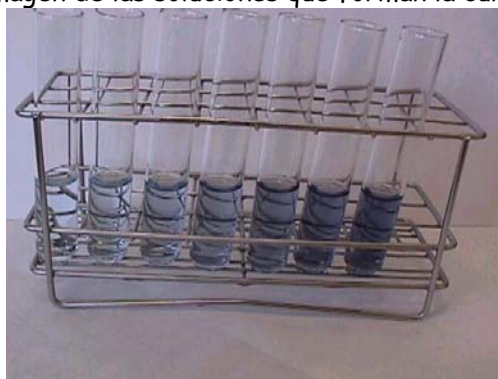
1. Preparar el **reactivo A** realizando la siguiente mezcla:
 tartrato de sodio y potasio al 2%0.5 ml.
 CuSO₄•5H₂O al 1%0.5 ml.
 Na₂CO₃/NaOH al 2%/0.1 N.....49.0 ml.
 La relación de la mezcla es 1:1:98.
2. Preparar el **reactivo B** realizando la siguiente mezcla:
 Reactivo de fenol (Folin-Ciocalteu) 2 N..... 2.0 ml.
 Agua destilada para (trabajar 1 N).....2.0 ml.
 La relación de la mezcla es 1:2.....4.0 ml.
3. Preparar la curva patrón (todas las cantidades se indican en ml).

Cuadro 20. Curva patrón para cuantificación de proteínas.

	Blanco	1	2	3	4	5	6	7	Muestra 1	Muestra 2
Estándar.	0	0.02	0.04	0.06	0.1	0.2	0.3	0.4	0	0
SSF.	0.4	0.38	0.36	0.34	0.3	0.2	0.1	0.0	0.36	0.39
Muestra.	0	0	0	0	0	0	0	0	0.04	0.01
Reactivo A.	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0	2.0
Mezclar y dejar en reposo 10 min.										
Reactivo B	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2

Reposar 30 min.

Fig 29. Imagen de las soluciones que forman la curva patrón.



4. leer a 550 nm en el rango visible del espectro.

PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA¹.

1. Preparar recientemente los reactivos A y B como indica la mezcla de cada uno de los reactivos si no hay errores de las lecturas en el espectrofotómetro.
2. Preparar correctamente la curva patrón y en el orden que se indican los reactivos y el orden de concentración.
3. Utilizar siempre el tubo blanco para calibrar correctamente el espectrofotómetro y no haya errores en las lecturas de cada dilución.
4. Al realizar la lectura de cada sistema no tocar las celdas con las manos sucias, tenerlas limpias.

Cuadro 21. Riesgo de los reactivos de la práctica No 6.

	Sulfato de cobre pentahidratado	Carbonato de sodio	Tartrato de sodio y potasio	Cloruro de sodio al 0.9%(SSF)
SALUD	2	1	0	1
INFLAMABILIDAD	0	1	1	0
REACTIVIDAD	0	1	0	0
CONTACTO	2	1	0	1
EPP	C	A	A	A
ALMACENAJE	VERDE	VERDE	VERDE	VERDE

RESULTADOS.

Cuadro 22. Resultados de la cuantificación de proteínas.

No de tubo	1	2	3	4	5	6	7	Muestra 1	Muestra 2
[alb mg/ml]									
Absorbancia									

Luego se realiza la curva patrón de acuerdo a la relación y resultados obtenidos se construye una gráfica en regresión lineal.

Se reporta las muestras interpolando y se obtiene la concentración de inmunoglobulinas mg/ml.

Pegar la hoja de papel milimétrico con la gráfica de la curva patrón.



BIBLIOGRAFÍA.

1. LOWRY. HO . ROSEBROUGH, N.H, FARR, A . L, RANDALL, R.J. J. Biol, Chem, 1931 265. 1951.
2. STAUTON WEST DR. EDWARD, 1969, Bioquímica Médica, 4ª edición. Editorial Interamericana, México DF, 1206pp.

PRÁCTICA No 7 DOBLE DIFUSIÓN.

Objetivo:

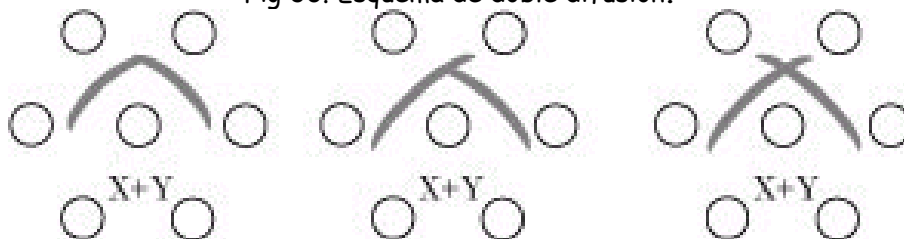
Como parte de un control de calidad de un antisuero también se debe evaluar la funcionalidad de los mismos. Para la cual es adecuada una prueba de doble difusión que hace visible la reacción antígeno-anticuerpo por medio de una línea de precipitación en un soporte semisólido esta prueba se utiliza principalmente para evaluar sueros hiperinmunes obtenidos en animales.

INTRODUCCIÓN.

El método en placas fue descrito por **Ouchterlony**, que luego fue transformado en micrométodo al emplear portaobjetos cubiertos con agar al 1.5% en solución salina como base de la reacción. Consiste en enfrentar en pequeñas perforaciones efectuadas en el agar, y a distancias convenientes, las soluciones de antígeno y anticuerpo. Al difundir ambos y ponerse en contacto, producirán una banda de precipitación cuando estén en relación óptima. Si la concentración de Ag y Ac colocados en los pozos es la que corresponde a la zona de equivalencia, la banda de precipitación estará situada aproximadamente en la distancia media que separa esos pozos. Con esta técnica puede tenerse una idea de las relaciones entre los pesos moleculares de los antígenos y anticuerpos reaccionantes. Trabajando con concentraciones óptimas de Ag y Ac, si la banda de precipitación formada es recta, indica que los pesos moleculares de ambos son muy próximos. Si la banda es cóncava con respecto al pozo del Ag, señala que el peso molecular de este es superior al del Ac, siendo menor en el caso en que la banda presente convexidad. Todo esto es una consecuencia de las leyes generales de la difusión, que establecen que la distancia a la que una sustancia difunde esta en relación directa con su concentración y en relación inversa con su peso molecular. Es posible identificar varios sistemas reaccionantes simultáneamente, pues cada uno de ellos dará una banda de precipitación específica. En este sistema se usa una fase sólida (agarosa) en un pozo central se coloca el Ac soluble (suero humano ó de animal) y en los pozos periféricos se colocan diluciones del antígeno ó de los antígenos contra los que va dirigido el anticuerpo (1,2).

El suero de Coombs: se obtiene inyectando suero humano que contiene inmunoglobulina humana en conejo, el conejo produce Ac contra inmunoglobulina humana estos anticuerpos se extraen del suero de conejo es llamado antisuero de inmunoglobulina ó suero de Coombs (2).

Fig 30. Esquema de doble difusión.



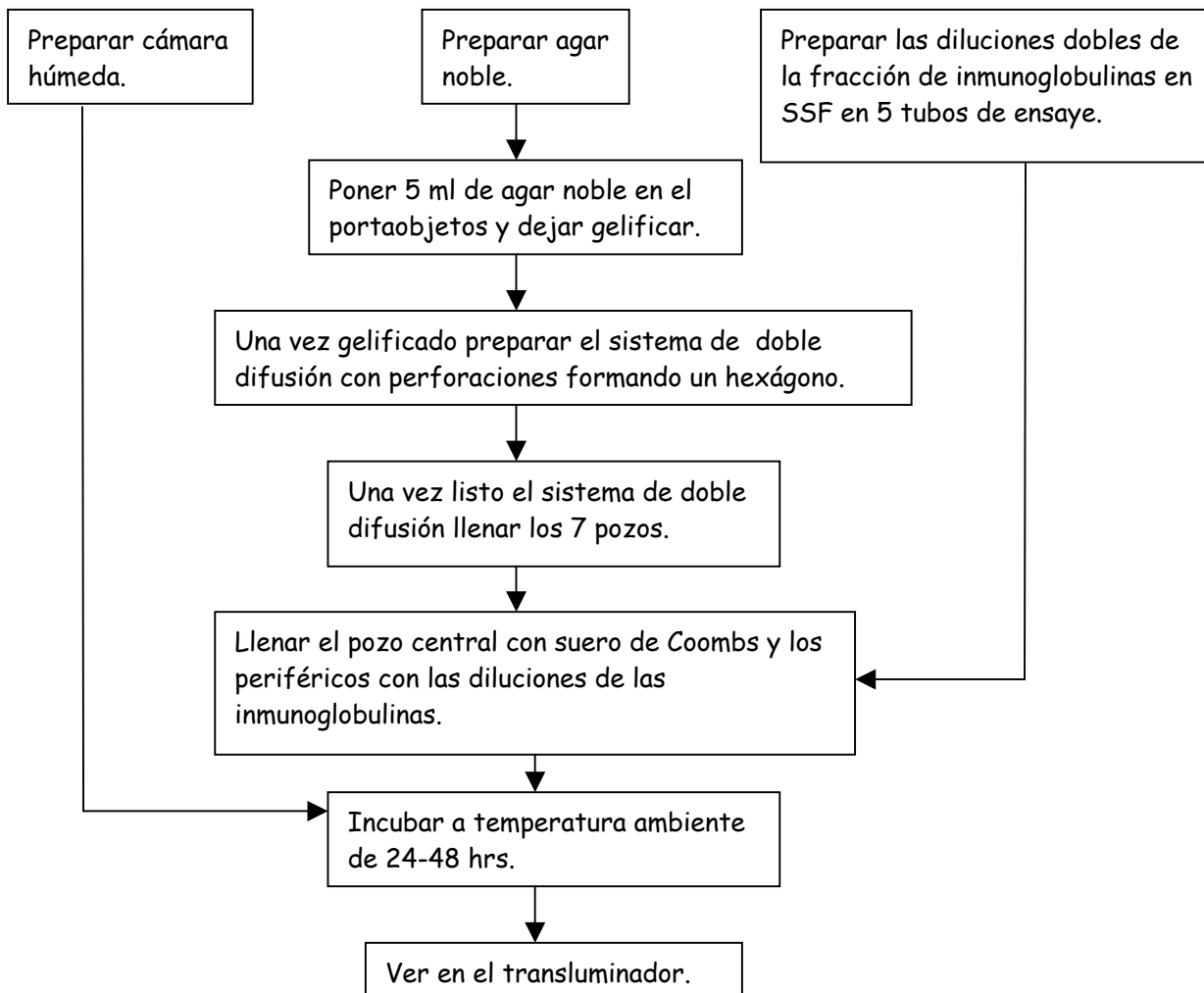
MATERIAL.

Un portaobjetos.
Una caja Petri.
Aplicadores de Madera.
Algodón ó papel.
Una micropipeta de 50 μ l.
6 tubos de ensayo de 13x100 mm.
Una gradilla.
Transluminador.
Un repuesto de tinta.
Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
Una pipeta graduada de 10 ml.
Una gradilla para tubos Wintrobe.

REACTIVOS.

Agar Noble.
SSAF (NaH_2PO_4 2.585g, Na_2HPO_4 7.98g Y NaCl 4.25g en H_2O cbp 1000ml).
Fosfato de sodio monobásico NaH_2PO_4 .
Fosfato de sodio dibásico Na_2HPO_4 .
Azida de Sodio.
Suero de Coombs.
Muestra Problema (fracción de inmunoglobulinas) obtenido anteriormente.

Fig 31. Diagrama de flujo doble difusión.



METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA^{1,2,3,4}.

Preparación de diluciones dobles.

1. Colocar 50 μ l de SSF en 5 tubos de ensaye.
2. En el primer tubo colocar 50 ml del dializado de inmunoglobulinas y mezclar; transferir 50 μ l al 2° Tubo y mezclar, transferirlos al 3° tubo y así sucesivamente hasta el 6° tubo.

Preparación del agar.

1. Preparar el SSAF.
2. Disolver 0.5 g de agar noble en 50 ml de SSAF.
*SSAF: (NaH_2PO_4 , Na_2HPO_4 , y NaCl).
3. Agregar 1ml de azida de sodio 0.1M.
4. Poner los portaobjetos en la gradilla de Wintrobe para que estén nivelados.
5. Agregar 5 ml de agar noble al portaobjetos y dejar gelificar de 10-15 min.
6. Perforar el agar gelificado con un repuesto de pluma formando un hexágono.
7. Llenar los pozos con las diluciones en el orden diluyente que se indica.

Fig 32. Esquema de un antisuero utilizando diluciones dobles.

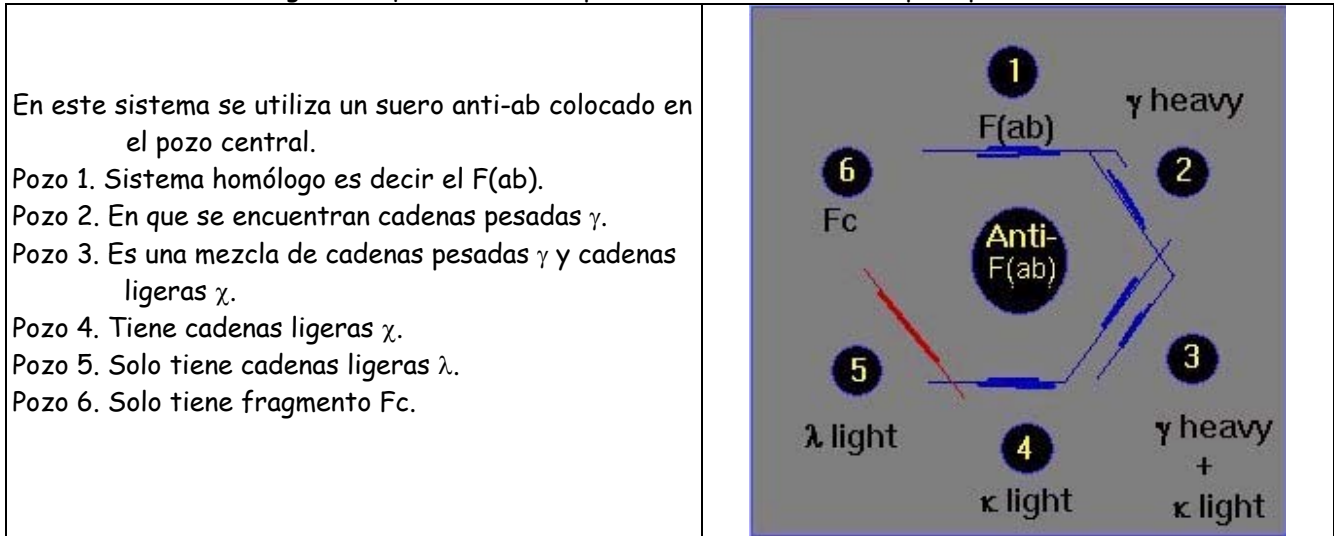


Nota: los pozos deben tener 3 mm de distancia entre cada pozo.

Pozo	1	2	3	4	5	6
Dilución	Concentrado	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32

8. Se vierte el suero de Coombs en el pozo central.
9. Incubar en cámara húmeda a temperatura ambiente de 24 a 48 hrs.
10. Se observa el portaobjetos en el transluminador.

Fig 33. Esquemas de interpretación de las líneas de precipitación.



INTERPRETACIÓN.

- Entre los pozos 1 y 2 identidad parcial.
- Entre los pozos 2 y 3 identidad parcial e identidad total.
- Entre los pozos 3 y 4 identidad total.
- Entre los pozos 4 y 5 no hay identidad.
- El pozo 5 no hay reconocimiento.

PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ¹.

1. Se debe calentar suavemente el agar noble por que de lo contrario el agar se caramelizará.
2. Se debe evitar que el agar quede muy concentrado, ya que al formar los pozos puede fragmentarse.
3. Realizar correctamente la preparación de diluciones del dializado de inmunoglobulinas en SSF.
4. Respetar la distancia de 3 mm de cada pozo si no al desarrollarse la técnica puede resultar falsos (+) ó (-).
5. Llenar correctamente cada pozo si no también habrá error de lectura.

Cuadro 23. Riesgo de los reactivos de la práctica No 7.

	Azida de sodio.	Fosfato de Sodio monobásico.	Fosfato de Sodio dibásico.
SALUD	3	1	1
INFLAMABILIDAD	2	0	0
REACTIVIDAD	4	1	1
CONTACTO	3	2	2
EPP	D	A	A
ALMACENAJE	AMARILLO RAYADO	VERDE	VERDE

RESULTADOS.

La técnica de doble difusión se basa en la reacción Ag-Ac entonces deben observarse bandas de precipitación, si son líneas de identidad hay semejanza entre los antígenos y si son líneas sin identidad el significado no hay relación entre los antígenos probados pero aún estas revelan la línea de precipitación esto indica presencia de un sistema antígeno-anticuerpo por lo tanto ambas lecturas son positivas si no hay líneas de precipitación en ambas lecturas el resultado es negativo.

Fig 34. Esquema del resultado de bandas de precipitación.

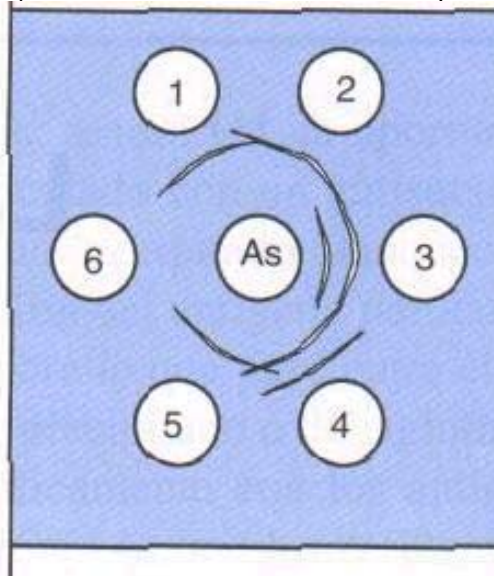
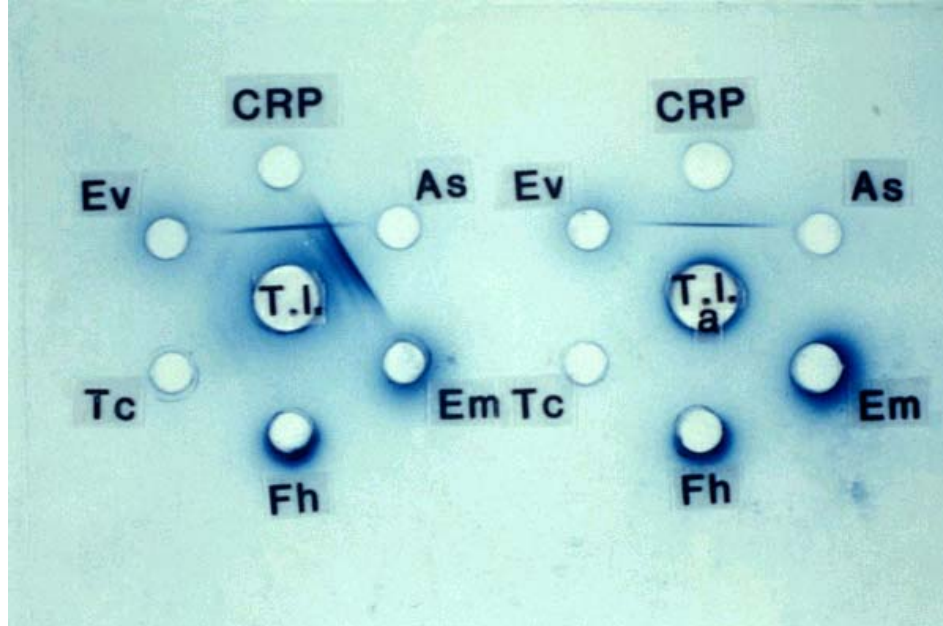


Fig 35. Imagen real en donde se observa la precipitación en la doble difusión.



RESULTADOS.

1.- ¿Es posible observar bandas de precipitación?

R=

2.- ¿Se pueden identificar más de una línea de precipitación entre 2 pozos?

R=

3.- ¿Hasta que dilución del suero problema es posible encontrar líneas de precipitación?

R=

4. ¿Es posible en el sistema utilizado identificar líneas de identidad total, parcial y no identidad?

R=

BIBLIOGRAFÍA.

1. AGUILAR TORRENTA FAVIOLA 2001. Manual del Curso Practico de Inmunología, 1ª edición, Editorial ENCB IPN, México DF, 204 pp.
2. GRADWOHL. 1986. Métodos y Diagnósticos del Laboratorio Clínico, Volumen I, 8ª edición, Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 1110 pp.
3. MARGINI, RICARDO ANIBAL. 1996. Inmunología e Inmunoquímica. 5ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 976 pp.
4. ROJAS ESPINOSA, OSCAR. 2001. Inmunología (de memoria), 2ª edición, Editorial Panamericana. México, DF. 374 pp.

PRÁCTICA No 8

ANATOMÍA DEL SISTEMA INMUNITARIO.

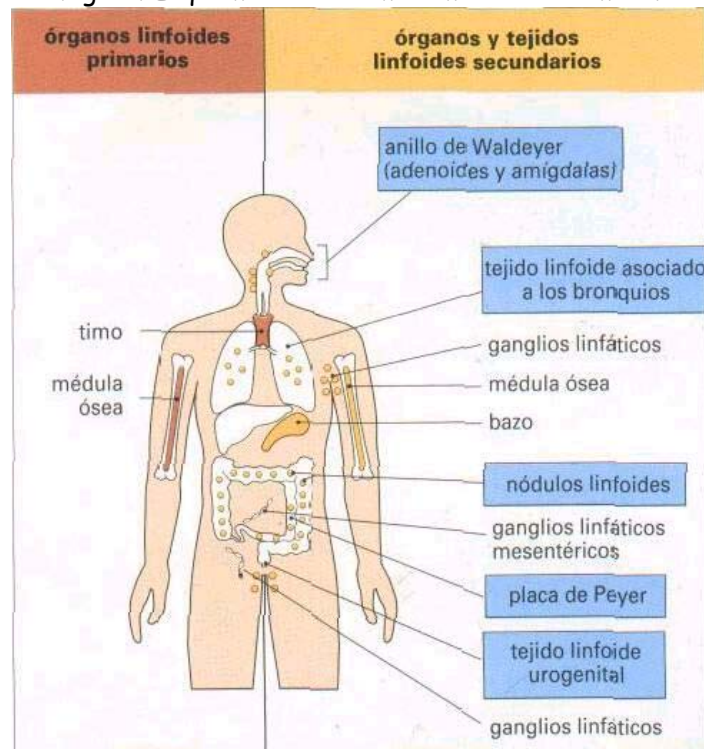
Objetivos:

Se conocerán los órganos y células que conforman el sistema inmunitario y la importancia que tiene este en el ser humano comparándolo con el de ratón. Se realizara la extracción de algunos órganos del sistema inmunitario del ratón y se obtendrá una suspensión de las células que lo contienen. Por otra parte se purificaran leucocitos humanos y se determinara su viabilidad con el propósito de obtener células las cuales pueden ser estudiadas por análisis de citometría de flujo o inmofluorescencia.

INTRODUCCIÓN.

El sistema inmunitario esta constituido de órganos, células y moléculas cuya función es mantener la homeostasia y la respuesta inmunologica contra patógenos. La primera fase de cualquier respuesta inmunitaria consiste en el reconocimiento del patógeno o del material extraño para poder iniciar después una reacción destinada a eliminarlo. Los órganos que conforman el sistema inmunitario se dividen en órganos linfoides primarios, órganos linfoides secundarios (2) y organos linfoides terciarios.

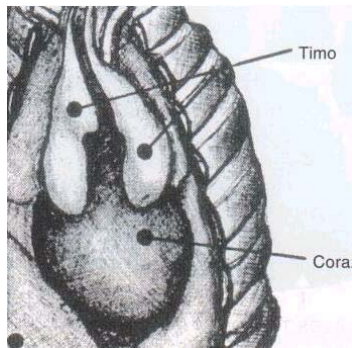
Fig 36. Esquema del sistema inmunitario humano.



Los órganos linfoides primarios son los lugares en los que se produce la linfopoyesis, en ellos, los linfocitos se diferencian a partir de las células madre linfoides, proliferan y dan lugar, finalmente, a células maduras funcionales. Los linfocitos T maduran en el timo, mientras que los linfocitos B maduran en medula ósea (2).

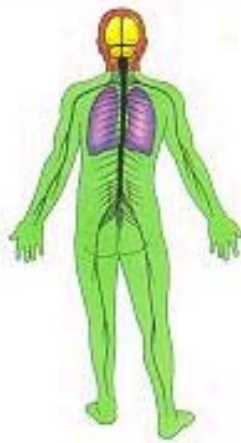
El Timo: es un órgano involucrado en la maduración de linfocitos T desde el nacimiento y es en esta etapa cuando alcanza su mayor tamaño con relación al tamaño de la masa corporal. En etapas avanzadas de la vida, el timo aparece como un órgano atrofiado y tiene poca participación en los mecanismos inmunitarios del individuo. Sin embargo, aunque reducida, la competencia inmunitaria de los individuos maduros se mantiene gracias a los linfocitos T de memoria que a lo largo del tiempo se han establecido en los órganos linfoides secundarios (2).

Fig 37. Esquema del timo.



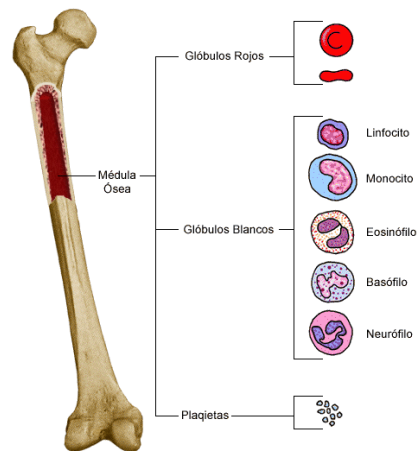
La Medula Ósea: posee un sistema de irrigación sanguínea aferente y eferente y un sistema de drenaje linfático, aunque no recibe linfa aferente. A través de las circulaciones sanguínea y linfática, las células de la medula llegan a otros órganos donde terminan su maduración o donde ejercen sus funciones programadas. La medula ósea es también un órgano donde se localizan las células. Poco tiempo después de la estimulación antigénica, la mayoría de las células productoras de anticuerpos se encuentran en los ganglios linfáticos y en el bazo, pero después, especialmente durante las respuestas secundarias, la mayoría de las células productoras de anticuerpos se localizan en la medula ósea. Los órganos linfoides periféricos responden rápidamente al estímulo antigénico, pero las respuestas son de corta duración; las células localizadas en la medula ósea responden más tardíamente, pero las respuestas son más intensas y más duraderas. En este sentido es el órgano responsable de la inmunidad humoral en las respuestas secundarias (2).

Fig 38. A) La medula ósea.



A

B) Las células sanguíneas.

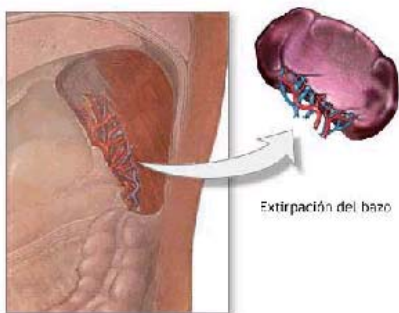


B

Los órganos linfoides secundarios son el sitio donde se almacenan las células inmunitarias es el lugar en donde entran en contacto con el antígeno dichas células, después de este contacto se produce la proliferación y la diferenciación de los linfocitos T y B, así como el cambio de isotipo en los linfocitos B, los órganos que lo conforman son: el bazo, los ganglios linfáticos y los tejidos asociados a mucosas, entre los que se encuentran las amígdalas y las placas de Peyer en el íleon del intestino delgado (2).

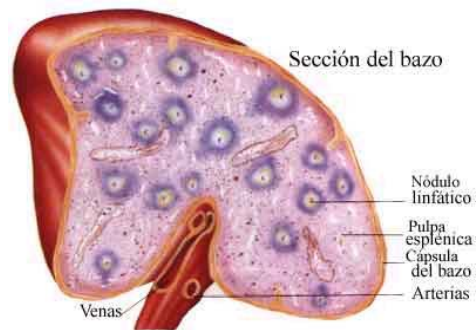
Bazo: tiene forma ovoide es rojo-vino, la masa esplénica consta de una porción conocida como pulpa blanca, donde se encuentran los linfocitos. La pulpa blanca se acumula alrededor de las ramas de la arteria esplénica central, formado de estructuras envolventes o vainas cilíndricas, que se mantienen parcialmente separadas de la pulpa roja por una capa de tejido linfoide laxo, conocida como zona marginal. Dentro de la pulpa blanca los linfocitos se distribuyen tanto en forma dispersa como agrupadas en nódulos o folículos. Los linfocitos T predominan en el tejido linfoide disperso, mientras que los linfocitos B se localizan principalmente en los folículos linfoides (2).

Fig 39. A) Extracción del bazo.



A.

B) Corte transversal del bazo.

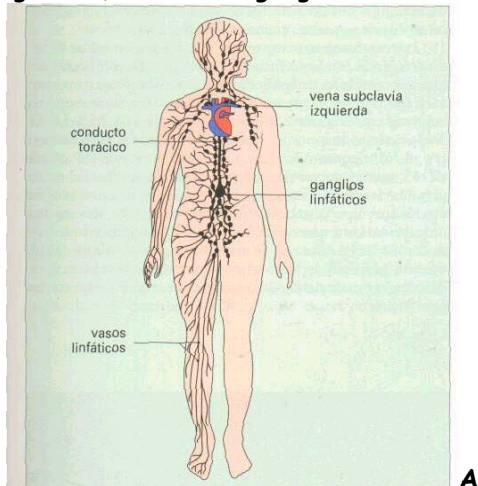


B

Muchos antígenos, incluyendo microorganismos, llegan a la pulpa blanca acarreados por la sangre y ahí interaccionan con los linfocitos para iniciar la respuesta inmunitaria. Los productos resultantes, linfocitos sensibilizados y de memoria, anticuerpos y citocinas, abandonan el órgano a través de los vasos sanguíneos aferentes para distribuirse a otros sitios (2).

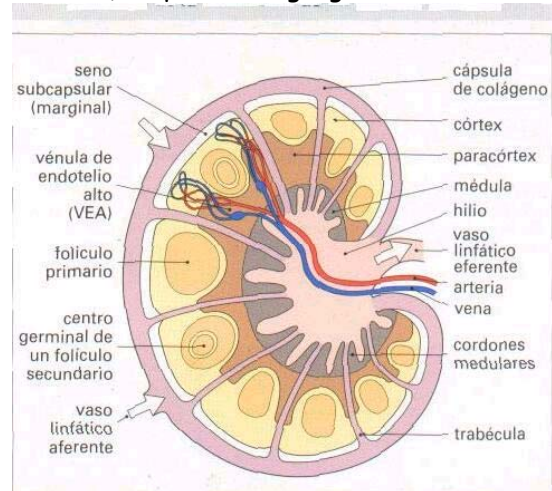
Ganglios Linfáticos: son estructuras ovoides ordenadas en forma de rosario y distribuidas en todo el organismo, pero particularmente en el cuello, la cavidad torácica, las axilas, el tronco, las ingles, la región poplíteica y la cavidad peritoneal. Los ganglios linfoides se conectan a otros ganglios a través de los vasos linfáticos, la mayoría de los antígenos llega a los ganglios linfáticos, acarreados por la sangre y la linfa; aquellos que penetran por la piel son capturados por las células dendríticas y de Langerhans (fagocíticas) las que los transportan a los ganglios linfáticos regionales donde son procesados y presentados a los linfocitos T y B (2).

Fig 40. A) El sistema ganglionar linfático.



A

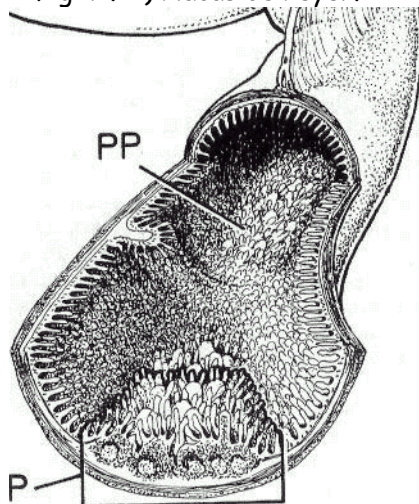
B) Esquema del ganglio linfático.



B

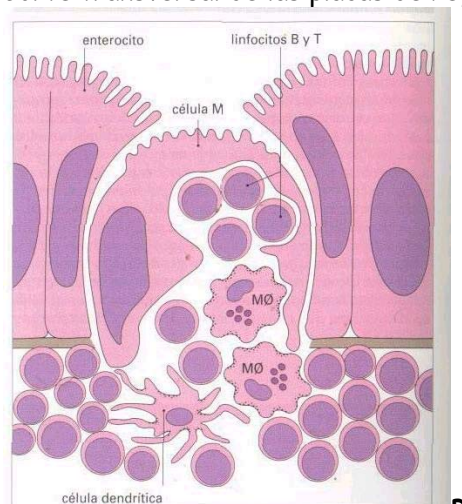
El Tejido Linfoide Asociado a Mucosas: además de los órganos linfoides sólidos, está el tejido linfoide no encapsulado asociado a las mucosas. Este tejido se encuentra localizado en la membrana basal de las mucosas respiratoria, digestiva, genitourinaria, las amígdalas, como en el caso de las **placas de Peyer** que se encuentran en el íleon del intestino delgado, el epitelio intestinal que recubre las placas de Peyer es un epitelio especializado, que permite el transporte de los antígenos hacia el tejido linfoide. Esta misión es llevada a cabo por ciertas células epiteliales, denominadas células M estas células contienen profundas invaginaciones de la membrana plasmática, que forman invaginaciones en las que se alojan linfocitos B y T, células dendríticas y macrófagos. Los antígenos y los microorganismos entran por estas invaginaciones hacia el tejido linfoide mucoso organizado subyacente al epitelio (2).

Fig 41. A) Placas de Peyer.



A

B) Corte transversal de las placas de Peyer.



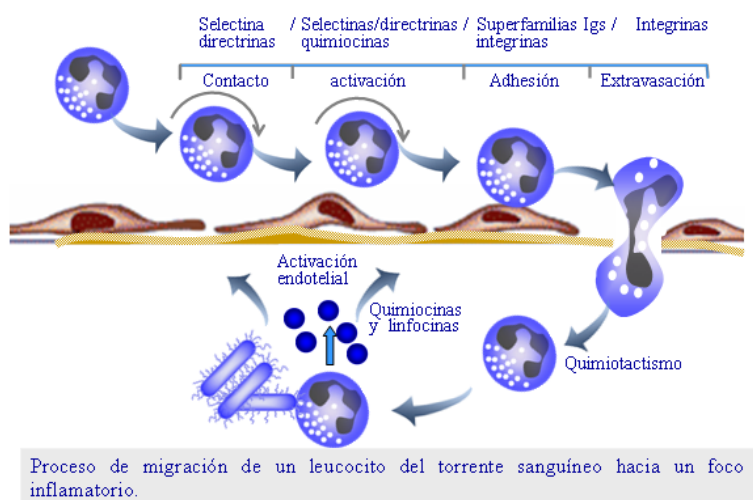
B

Los Órganos Linfoides Terciarios.

Los linfocitos efectores-memoria se extravasan en tejidos linfoides terciarios (tejidos donde se produce la respuesta inmunitaria) especialmente si están inflamados. Los mediadores liberados en procesos inflamatorios localizados también actúan sobre otros órganos diana distintos del que es origen de la inflamación. La acción de estos mediadores provoca la respuesta de fase aguda. Los inductores de las respuestas sintéticas a la inflamación son citocinas proinflamatorias como el $TNF\alpha$, la Interleucina-1, la Interleucina-6 y la Interleucina-8 y el $TGF\beta$. Estos mediadores tienen efectos sobre el hígado, la médula ósea, hipófisis, tejidos musculares y adiposos.

El proceso inflamatorio consiste esencialmente en la extravasación de líquido y células (polimorfonucleares, linfocitos y monocitos) hacia un sitio definido, en donde ocurre, en mayor o menor grado, lisis de células y destrucción de componentes de la matriz extracelular. De acuerdo a su comportamiento temporal, la inflamación puede ser aguda o crónica; en la primera, el infiltrado inflamatorio es a base principalmente de leucocitos polimorfonucleares neutrófilos, en tanto que en la segunda las células del infiltrado son principalmente linfocitos y monocitos/macrófagos; cuando este tipo de inflamación es de muy larga duración, el tejido afectado puede adquirir algunas características del tejido linfoide, principalmente la presencia de nódulos linfáticos y vasos sanguíneos con endotelio cuboidal ("órganos linfoides terciarios").

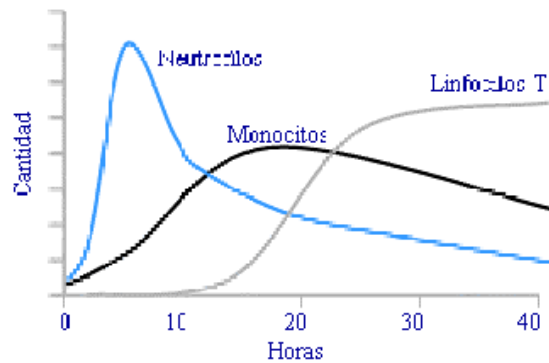
Fig 42. El proceso inflamatorio.



La extravasación de leucocitos hacia sitios de inflamación es un proceso en el que participan en forma concertada y secuencial diversas moléculas de adhesión. De hecho, se menciona que este proceso es un fenómeno en cascada, en donde es necesario que los eventos iniciales ocurran para que los que les siguen puedan suceder. En la actualidad se ha determinado que el proceso de extravasación de leucocitos incluye a las siguientes etapas: 1) interacción inicial leucocito endotelio; 2) rodamiento de leucocitos sobre el endotelio; 3) activación leucocitaria; 4) adhesión firme al endotelio, y; 5) migración transendotelial.

La gráfica indica la cantidad y el orden de migración de los linfocitos durante la inflamación. (ver figura 43).

Fig 43. Gráfica del orden de migración de los leucocitos.



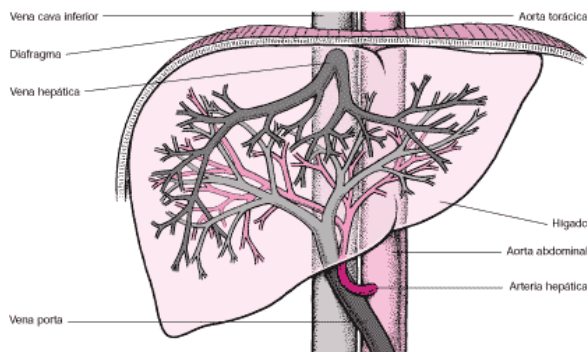
El Hígado.

Lesiones alterativas predominantemente centrolobulillares: cuerpos acidófilos (necrosis celular aislada de coagulación), balonización (degeneración vesicular hidrópica), necrosis lítica (necrosis precoz); la trama reticular del hígado está conservada. Los mecanismos por los que se produce la lesión de los hepatocitos no han sido aclarados: probablemente son de tipo inmunológico. (ver figura 44-B).

Infiltrado inflamatorio: hay infiltración linfo-histiocitaria en todos los espacios porta, e infiltración en el lobulillo, que puede ser difusa ó focal. El curso de infecciones sistémicas, también afectan al hígado. Por ejemplo, *citomegalovirus*, *herpes viridae*, mononucleosis infecciosa.

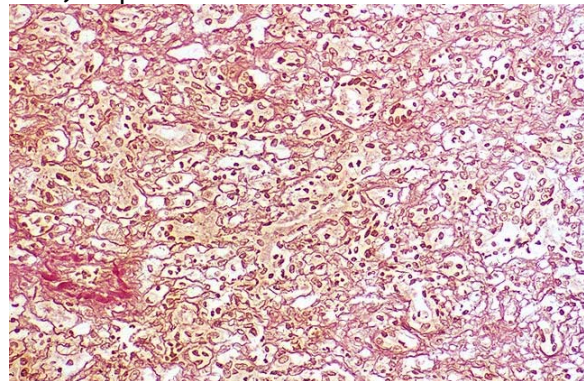
Corte histológico a mediano aumento que muestra la distorsión del retículo hepático, debido a la ausencia de hepatocitos en las trabéculas. Sólo se reconocen núcleos de células endoteliales, células de Kupffer y linfocitos (tinción de reticulina-Van Gieson). (ver figura 44-B).

Fig 44. A) Esquema del hígado.



A

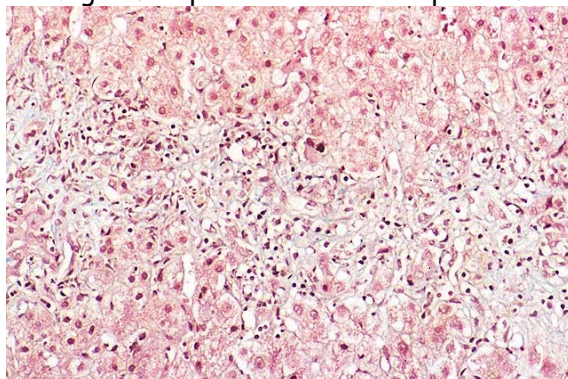
B) Biopsia de lesiones alterativas.



B

Necrosis en puente. Corte a mediano aumento que muestra hepatocitos tumefactos. En la franja horizontal del medio se observa ausencia de hepatocitos (consecuencia de necrosis "lítica"). En dicha área se observa infiltración por linfocitos y las fibrillas celestes indican un leve grado de colapso del retículo. (ver figura 45).

Fig 45. Biopsia de necrosis en puente.



En esta práctica solo se utilizarán el timo, bazo y placas de Peyer extraídas de ratón y una muestra de sangre humana una vez macerados los órganos se realizarán los lavados celulares y serán resuspendidos en SSF serán formados en una suspensión se mezclara con azul de tripan, de la muestra de sangre se obtendrán los linfocitos por centrifugación de gradiente de **Ficoll-Hypaque**, el Ficoll es un polisacárido que produce la aglutinación de los eritrocitos logrando que estos sedimenten más rápidamente y el Hypaque es una sustancia densa que, diluida apropiadamente, confiere a la mezcla de la densidad requerida para la separación. El aislamiento de las células mononucleares se realiza teniendo en cuenta la diferencia de densidades que existe entre los elementos de la sangre. Los eritrocitos y los granulocitos poseen una baja densidad mayor a 1.077g/ml y por lo tanto se ubicarán por debajo de la capa del gradiente de esa densidad mientras que los monocitos, linfocitos y las plaquetas al ser menos densos, flotarán por encima.

Las plaquetas serán separadas de las células mononucleares por medio de lavados sucesivos o por centrifugación a través de un gradiente de suero fetal bovino, que permite que las células mononucleares se sedimenten. Una vez separados los linfocitos y lavados. La suspensión se mezcla con azul de tripan. El azul de tripan es un colorante de gran peso molecular que sólo es capaz de entrar, en las células que tienen membrana alterada. Por lo tanto una célula viva en perfecto estado se observará incolora mientras que una célula muerta o

muy alterada se observará azul. De este modo se podrá determinar la viabilidad celular, es decir la relación de células vivas y células muertas en la cámara de Neubauer (1).

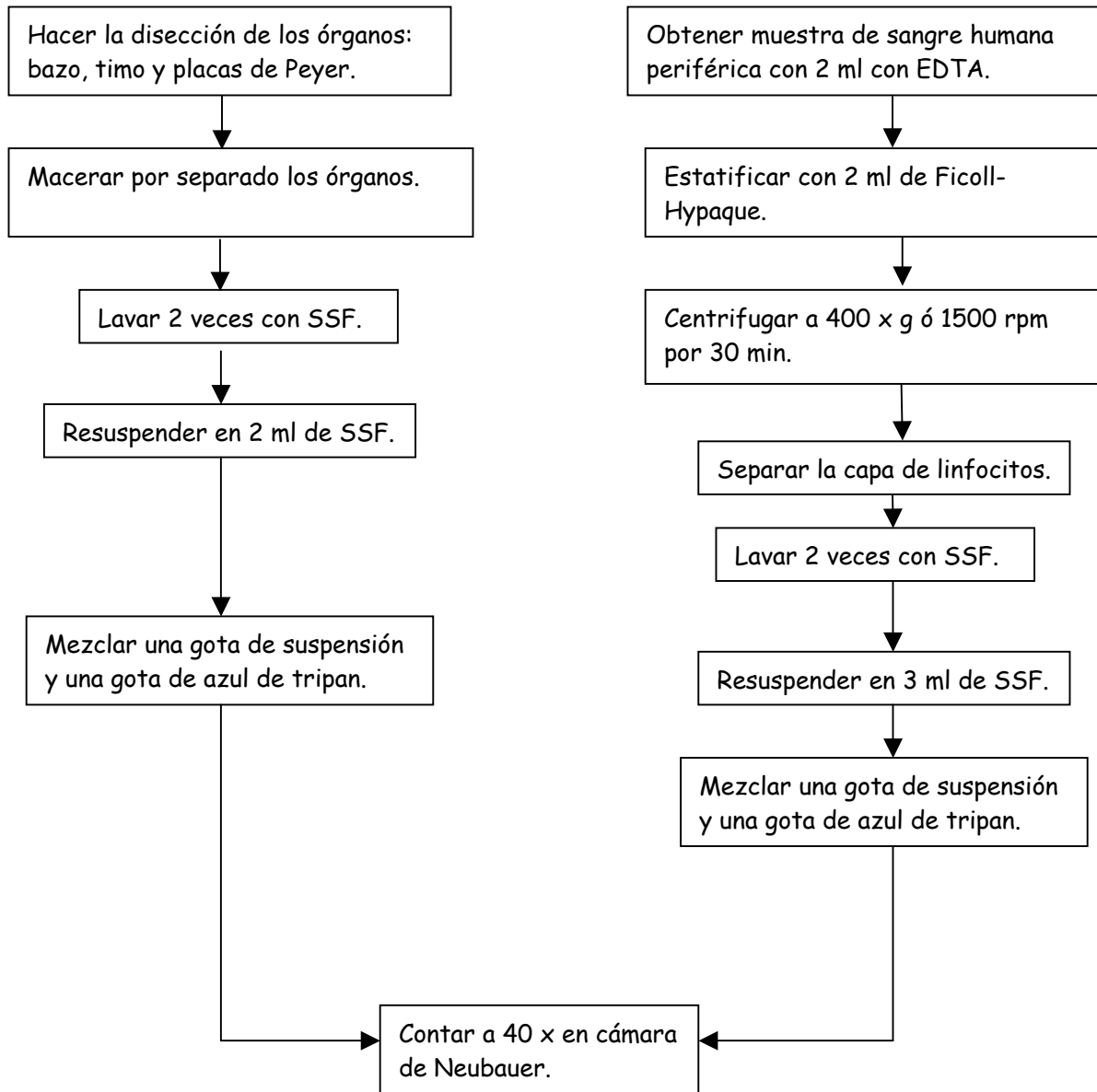
MATERIAL.

Mango para Bisturí.
1 gradilla.
10 tubos de ensayo de 13x100.
3 pipetas Pasteur.
3 coladeras.
3 émbolos de jeringa.
2 cajas Petri.
2 pipetas de 2 ml.
Pinzas de disección.
Cámara de Neubauer.
Microscopio.
Tubo vacutainer con EDTA con aguja.

REACTIVOS.

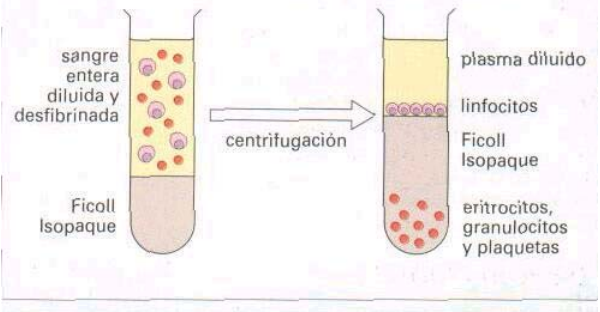
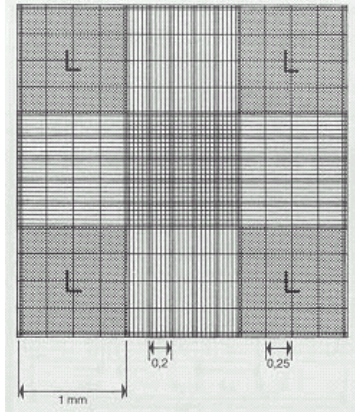
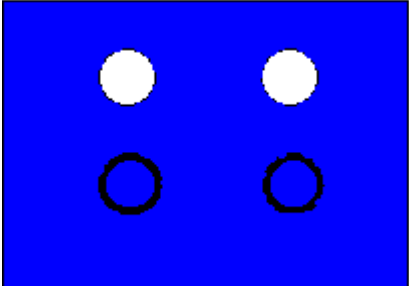
8 g de Cloruro de sodio NaCl.
0.2 g de Fosfato de potasio monobásico KH_2PO_4 .
2.9 g de Fosfato de potasio dibásico dodecahidratado $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$.
0.2 g de Cloruro de potasio KCl.
Disueltos en H_2O suficiente para 1 litro de PBS.
15 ml de Ficoll-Hypaque. (reactivo comercial).
1 ml de azul de tripan.
SSF.

Fig 46. Diagrama de flujo de la anatomía del sistema inmunitario.



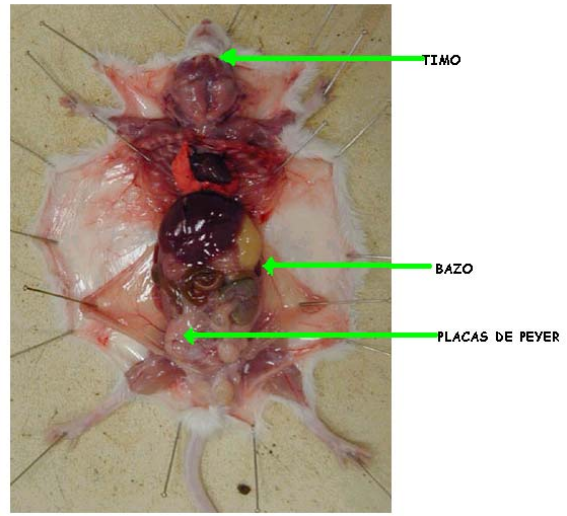
METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ^{1,2}.

I. Obtención de linfocitos por gradiente de densidad.

<ol style="list-style-type: none"> 1. Colocar 3 ml de Ficoll-Hypaque en un tubo de ensaye. 2. Obtener 2 ml de sangre con anticoagulante. 3. Estratificar la sangre sobre el Ficoll-Hypaque, no mezclar. 4. Centrifugar a $400 \times g$ ó 1500 rpm por 30 min. 5. Separar la capa de linfocitos. 6. Lavar 2 veces con SSF. 7. resuspender en 2 ml de SSF. 	
<ol style="list-style-type: none"> 8. Mezclar una gota de la suspensión y una gota de azul de tripan. 9. Contar a $40 \times$ en cámara de Neubauer. 	
<ol style="list-style-type: none"> 10. Al observar en los 4 cuadros de Neubauer ver los linfocitos vivos y los que se tiñeron azules muertos por diferente color para determinar la viabilidad. 	

II. Obtención de linfocitos por disección de los órganos linfoides.

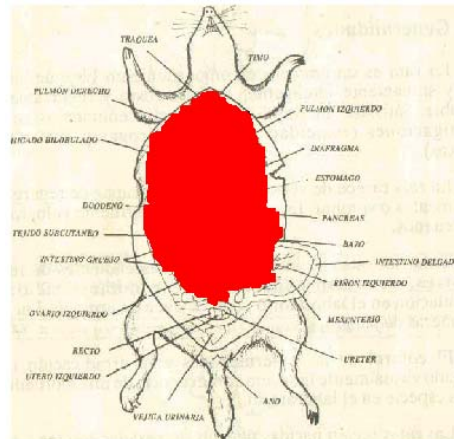
1. Realizar la disección del ratón y obtener los siguientes órganos, bazo, timo y Placas de Peyer.
2. Macerar el bazo, en una coladera, con el émbolo de una jeringa, agregar 1 ó 2 ml de SSF.
3. Realizar lo mismo con el timo y las Placas de Peyer.
4. Lavar 2 veces con SSF.
5. Resuspender en 1 ml de SSF.
6. Mezclar una gota de la suspensión y una gota de azul de tripan.
7. Contar a 40x en cámara de Neubauer.
8. De la misma forma determinar la viabilidad.



PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ¹.

1. Realizar con cuidado la disección del ratón de lo contrario hay irrigación de la sangre y se pierden de vista los órganos linfoides.

Fig 47. Irrigación de la sangre en la disección accidental en el ratón.



2. Una vez hecha la disección del ratón localizar los órganos linfoides principalmente el timo que es muy pequeño y al extraerlo debe ser con sumo cuidado por que si hay sangrado del corazón se pierde el órgano y difícilmente se distingue.
3. Una vez obtenidos el timo, bazo y placas de Peyer colocarlos en una caja Petri y no ponerlos en un papel por que se empiezan a pegar las células en el papel y se pierden linfocitos.
4. Macerarlos con cuidado.
5. Realizar los lavados de los órganos con SSF con la cantidad indicada si hay exceso se pueden fragmentar las células.
6. En la muestra de sangre al verterla, los 2 ml de muestra en los 3 ml de Ficoll-Hypaque no mezclar por que se rompe el gradiente.
7. Separar la capa de linfocitos del Ficoll-Hypaque con sumo cuidado procurando recuperar la mayoría de células.

Cuadro 24. Riesgo de los reactivos de la práctica No 8.

	Cloruro de sodio.	Fosfato de Potasio monobásico.	Fosfato de Potasio dibásico dodeca hidratado.	Cloruro de sodio.	Azul de tripan.
SALUD	1	0	1	0	1
INFLAMABILIDAD	0	0	0	0	1
REACTIVIDAD	0	0	1	0	1
CONTACTO	1	1	2	1	1
EPP	A	A	A	A	A
ALMACENAJE	VERDE	VERDE	VERDE	VERDE	VERDE

RESULTADOS.

1. Se realiza el conteo de células vivas y células muertas en forma individual por cada campo, por cada órgano y la muestra de sangre para determinar el total del número de células vivas y el número de células muertas de cada órgano y la muestra de sangre.

Cuadro 25. Resultados del conteo celular del timo.

CAMPO	1	2	3	4	TOTAL
No de células vivas.					
No de células muertas.					

Cuadro 26. Resultados del conteo celular del bazo.

CAMPO	1	2	3	4	TOTAL
No de células vivas.					
No de células muertas.					

Cuadro 27. Resultados del conteo celular de las placas de Peyer.

CAMPO	1	2	3	4	TOTAL
No de células vivas.					
No de células muertas.					

Cuadro 28. Resultados del conteo celular de la muestra de sangre.

CAMPO	1	2	3	4	TOTAL
No de células vivas.					
No de células muertas.					

RESULTADOS.

2. Se procede a calcular el No de células/mm³ de suspensión de cada órgano y la muestra:

$$\frac{\text{dilución del azul de tripan} \times 10}{4} = \text{Factor de dilución} \times \text{total de células vivas} = \text{No de células/mm}^3 \text{ de suspensión.}$$

3. Calcular el No de células/ml de suspensión:

4. Determinar la viabilidad de células de cada órgano y la muestra en porcentaje.

$$\frac{\text{Total de células vivas}}{\text{No de células vivas} + \text{No de células muertas}} \times 100 = \% \text{ de viabilidad.}$$

BIBLIOGRAFÍA.

1. AGUILAR TORRENTA FAVIOLA 2001. Manual del Curso Practico de Inmunología, 1ª edición, Editorial ENCB IPN, México DF, 204 pp.
2. ROITT, IVAN. 2000. Inmunología, 5ª edición. Harcourt editions. Madrid, España. 423 pp.

PRÁCTICA No 9

ELISA.

INMUNO ENSAYO ENZIMÁTICO.

Objetivos:

Conocer el método de ELISA y las características que presenta así como la reacción de Ag-Ac que se da en dicho proceso.

Poder diagnosticar la inmunidad humoral de un paciente a través del inmuno ensayo enzimático para saber si padeció enfermedades tales como sarampión y hepatitis C.

INTRODUCCIÓN.

Los términos que describen los procedimientos de inmunoanálisis ligados a enzimas son inmuno análisis enzimáticos (EIA), análisis inmuno absorbente ligado a enzimas (ELISA) o inmuno ensayo enzimático, que es una técnica en la cual uno de los reactantes, el anticuerpo o el antígeno se fija en un soporte sólido antes de su interacción con el reactante complementario son un anticuerpo conjugado y un substrato-cromógeno es el que indica y detecta la presencia del reactante a analizar virando a un color (2).

Pruebas inmuno enzimáticas (ELISA o EIA), (enzyme-linked-immuno-sorbent-assay), descritos hace 25 años, se basan en dos fenómenos biológicos importantes:

- 1.- la elevada especificidad de los Ac.
- 2.- la alta actividad de algunas enzimas usadas en este tipo de ensayos, lo que permite la amplificación de la señal generada por la muestra.

Independientemente de los esquemas experimentales empleados, los ELISA comprenden dos etapas generales:

- 1.- la reacción de un inmunorreactante con un Ag o Ac.
- 2.- la detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

La sencillez de ELISA, sumada a la potencialidad de los Ac monoclonales (AcMo) hace que día a día se vayan imponiendo sobre métodos tales como aquellos basados en la utilización de un trazador radiactivo (radioinmunoanálisis) RIA, un trazador emisor de luz (quimioluminiscencia) o un trazador fluorescente (fluorografía). La gran ventaja de ELISA sobre otros métodos reside en que no requiere un equipamiento demasiado sofisticado para su implementación en el laboratorio (2).

Clasificación de las pruebas inmuno enzimáticas:

Las pruebas inmuno enzimáticas pueden clasificarse en:

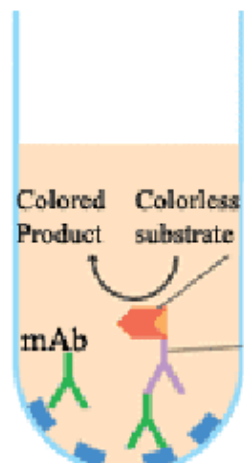
- a) Homogéneas.
- b) Heterogéneas.

Las primeras se realizan exclusivamente en fase líquida, mientras que en las segundas se emplea un soporte sólido para inmovilizar a uno de los inmunorreactantes. Por cuestiones de sencillez y aplicabilidad general, sólo nos dedicaremos a la descripción de las pruebas heterogéneas (2).

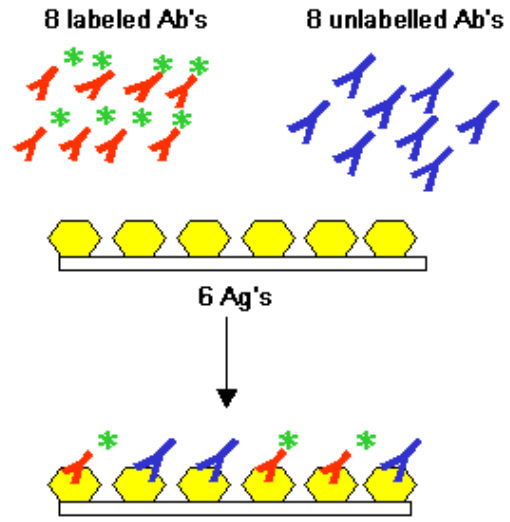
Las pruebas heterogéneas pueden clasificarse en 2 tipos:

- 1) Amplificación y de actividad.
- 2) Modulación y de actividad.

Fig 48. A) ELISA de amplificación de actividad.



B) ELISA de modulación competitiva.



En los inmuno análisis enzimáticos de amplificación de actividad o no competitivas (2).

Se emplea un gran exceso de inmunorreactante con el objeto de tener señal máxima debida de la presencia del compuesto al ser dosificado. De acuerdo a la ley de acción de masas, un exceso de inmunorreactante permite detectar niveles muy bajos del analito que se quiere determinar. Estos ELISA se subdividen de acuerdo a la molécula inmobilizada de la fase sólida. La inmobilización del Ag para detectar Ac es un sistema que tiene una alta detectabilidad debido a que varias moléculas del conjugado enzimático, que en este caso son Ac anti-Ig marcados con la enzima pueden unirse a cada molécula de Ac que reacciono con el Ag inmobilizado. Este efecto se traduce en una gran amplificación de la señal. Mediante la utilización de métodos de puenteo inmunológico (con Ac anti-Ig) o no inmunológico (con el sistema avidina-biotina o proteína A) es posible aumentar aún más la detectabilidad. Otro sistema de amplificación de actividad es el ELISA de captura, en el que se inmobilizan un Ac (Ac de captura), se captura Ag y se revela su presencia con un conjugado enzimático anti-Ag. Este sistema se emplea para la cuantificación de Ag o para la detección de Ac contra el Ag capturado. En general, es deseable que el conjugado enzimático y el Ac inmobilizado provengan de la misma especie para evitar interferencias en el sistema originadas por reacción cruzada del conjugado con el Ac de captura (2).

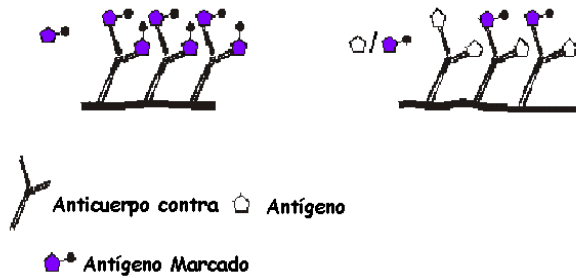
En el inmuno análisis enzimático de modulación de actividades competitivas (fig. 48 B) se modula la actividad del conjugado enzimático por competición con el analito. Menores cantidades del conjugado enzimático permiten obtener una detectabilidad mayor, ya que pequeñas cantidades del competidor tienen un gran impacto sobre la actividad enzimática detectada en la fase sólida. Según este método, el Ac que se va a dosificar se mezcla con una cantidad determinada de Ac marcado con la enzima, en condiciones en que haya competencia entre el Ac a dosificar y el Ac marcado, por un numero limitado de sitios del Ag inmobilizado sobre la fase sólida. Cuando no hay Ac que dosificar, la actividad enzimática es la más elevada, pero cuando mayor es la cantidad de Ac, menos Ac marcado se combina con el Ag inmobilizado y la actividad enzimática es menos elevada. Por tanto, la actividad enzimática es inversamente proporcional a la cantidad de Ac que se va a dosificar (2).

Existen 2 diseños generales de ensayos de modulación de actividad: en uno de ellos, el ligando marcado con enzima y el ligando sin marcar que se quiere cuantificar se incuban simultáneamente en el sistema: en el otro diseño, el ligando no marcado a ser cuantificado se incubaba en una primera etapa y en una segunda

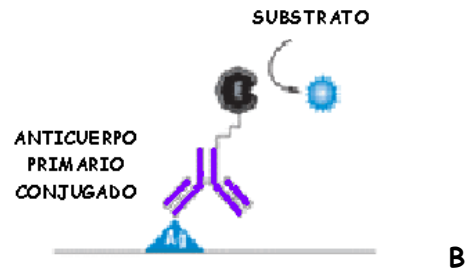
etapa se incuba con el ligando marcado enzimáticamente, el que reaccionará con los sitios no ocupados por el ligando que reacciono en la primera etapa (2).

Independientemente de estos 2 diseños generales, en ELISA de modulación de actividad se puede inmovilizar el Ac en la fase sólida y agregar el Ag marcado con la enzima (2).

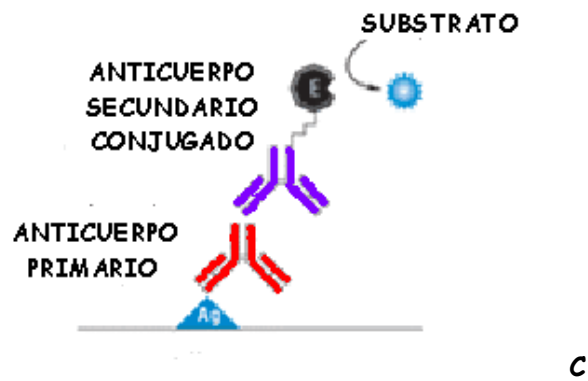
Fig 49. A) ELISA de modulación con Ag marcado.



B) ELISA de modulación con Ac marcado.



C) ELISA de modulación con Ac anti-Ig marcado para detectar Ac anti-Ag.



Se observará una disminución de la actividad enzimática a medida que se compete con cantidades crecientes de Ag libre presente en una solución patrón de Ag o en una muestra problema, siendo la concentración de producto coloreado formado inversamente proporcional a la concentración de Ag libre (2).

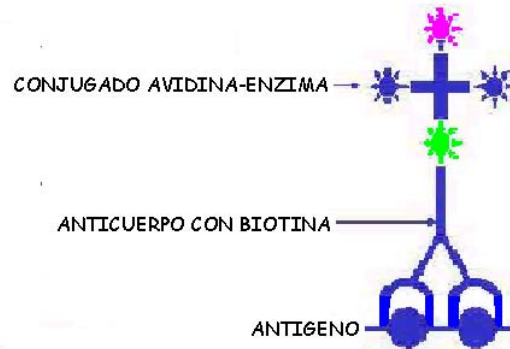
Alternativamente (Fig 49-B) es posible inmovilizar el Ag y usar Ac anti-Ag marcados con enzima. En este caso se realiza una competición de la unión de estos Ac al Ag inmovilizado, por medio de Ag libre presente en una solución patrón o en una muestra problema. Como consecuencia de esta competición, la actividad enzimática detectable disminuye a medida que se emplean concentraciones crecientes de Ag libre (2).

Una tercera variante (fig. 49-C) es usar el sistema descrito en el párrafo anterior con la diferencia de que se emplean Ac anti-Ag sin marca enzimática y en una etapa siguiente agregar un conjugado anti-Ig marcado con la enzima. Este ensayo es de modulación y amplificación de actividad y tiene la ventaja de que permite aumentar la detectabilidad del sistema (2).

Sistemas alternativos de reconocimiento.

La avidina es una proteína de la clara de huevo y la estreptavidina es una proteína producida por ciertas levaduras. Ambas se caracterizan por su elevada afinidad por biotina ($K_a = 10^{15}M^{-1}$). Debido a que la biotina es fácilmente aceptable a distintas proteínas (entre ellas, Ac y enzimas) por unión covalente sin afectar su actividad biológica, se han desarrollado métodos inmunoenzimáticos basados en la interacción avidina-biotina.

Fig 50. ELISA Sistema avidina-biotina.



La biotinylation se produce por reacción del grupo carboxilo de la biotina con grupos $-NH_2$ de residuos de lisina de las proteínas. En general se preparan ésteres de biotina con grupos químicos separadores (spacers) que permiten el residuo de biotina quede en una zona extrema de la molécula, accesible para la reacción posterior con la avidina (2).

Proteína A.

Es una proteína de la pared de *Staphylococcus aureus* (cepa Cowan I) que tiene alta afinidad ($K_a = 10^8M^{-1}$) por fragmentos Fc de algunos isótopos de las Ig, tiene 4 sitios de unión pero usualmente sólo reaccionan dos. Estas propiedades permitieron el desarrollo de diversos tipos de ensayos inmuno enzimáticos con proteína A.

Fig 51. Sistema ELISA con proteína A.

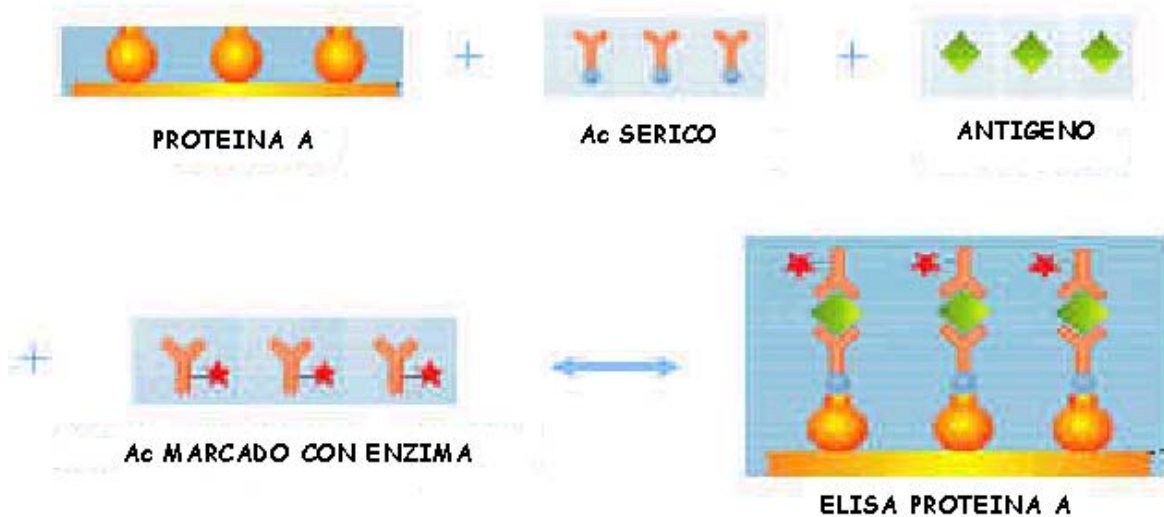
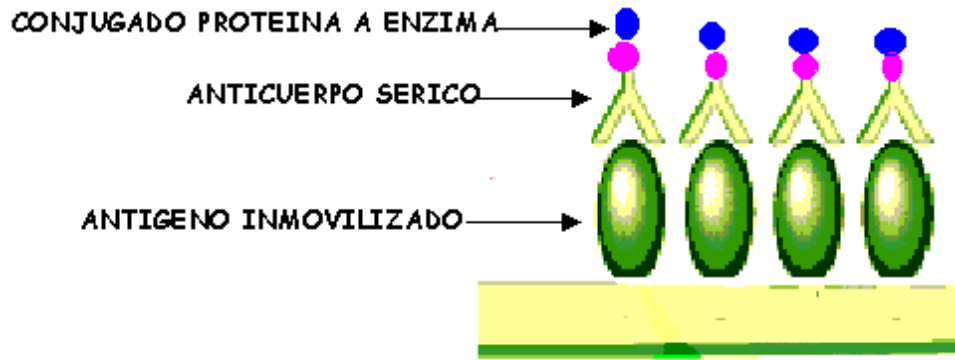


Fig 52. Sistema ELISA con proteína A inmobilizada.



ELISA DE CAPTURA:

Los sistemas de ELISA de captura tienen gran utilidad para la detección de Ac de distintas clases y subclases específicos de Ag. En la práctica este método se aplica para la determinación de IgM específica.

Fig 53. ELISA de captura.

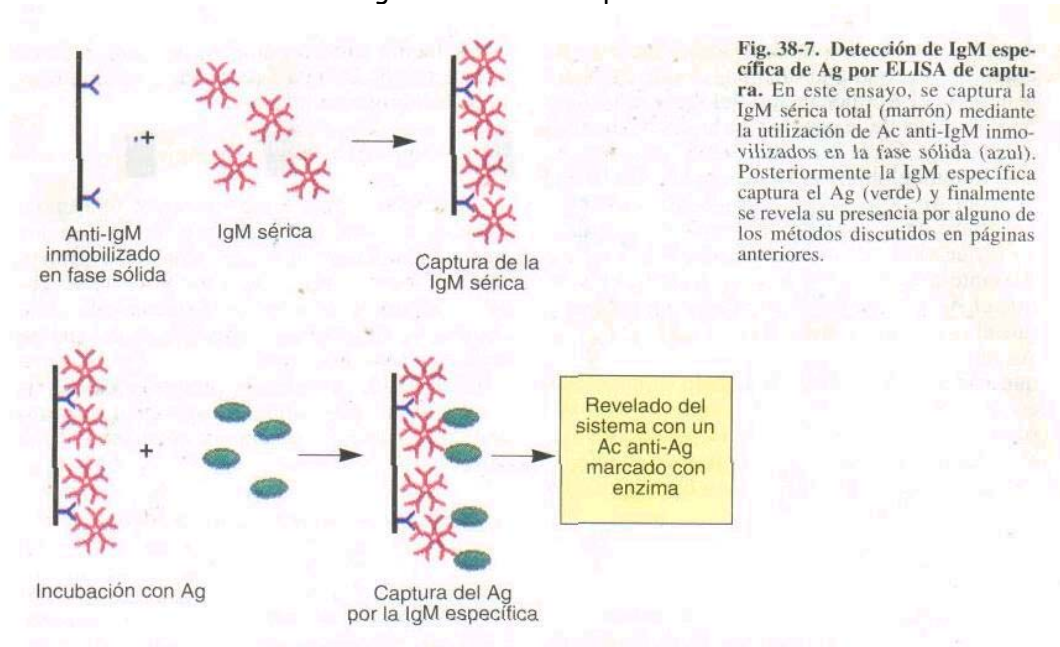


Fig. 38-7. Detección de IgM específica de Ag por ELISA de captura. En este ensayo, se captura la IgM sérica total (marrón) mediante la utilización de Ac anti-IgM inmobilizados en la fase sólida (azul). Posteriormente la IgM específica captura el Ag (verde) y finalmente se revela su presencia por alguno de los métodos discutidos en páginas anteriores.

Lo que es particularmente útil para diferenciar infecciones agudas crónicas. El sistema desarrollado para la determinación de IgM específica (o de Ac de distintas clases o subclases) consiste en inmobilizar Ac anti-clase o subclase de la inmunoglobulina que se desea determinar. Esto permite capturar todas las Ig séricas de clase o subclase del suero problema. Posteriormente el sistema se enfrenta contra el Ag específico. Si en el suero habían Ac-Ag-específicos de la clase o subclase, el Ag será capturado. Finalmente, sólo resta poner en evidencia la presencia del Ag capturado en la fase sólida (2).

En la presente práctica se realizara **ELISA indirecta** consiste en buscar Ac contra Ag conocidos, los pozos se recubren con el Ag, después se lavan y se tratan con proteína bloqueadora irrelevante y luego se incuban en el suero problema. Los Ac, retenidos por el Ag se detectan por adición de un segundo Ac conjugado a una enzima, que después se revela adicionando el substrato y un cromógeno. El resultado de la reacción es la formación de un producto coloreado soluble, se realiza para diagnósticar sarampión y hepatitis C (1,3).

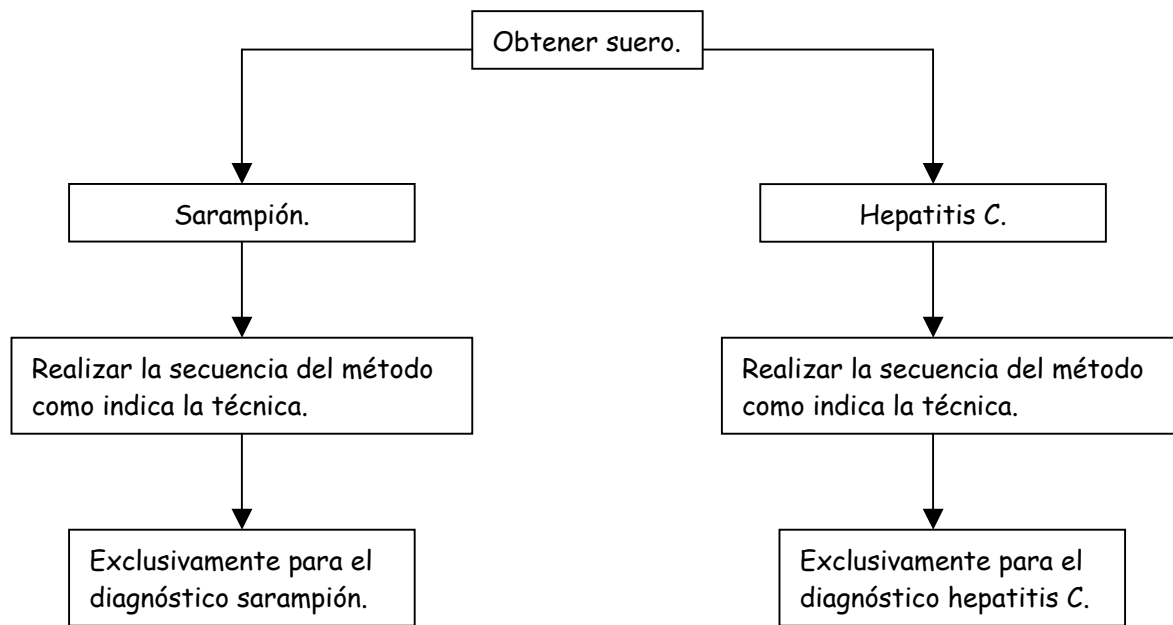
MATERIAL.

Tira de micropozos sensibilizados.
Con Ag de sarampión.
Con Ag de hepatitis C.
Tubo sin anticoagulante
Micropipetas de:
5-50 µl.
40-200 µl.
200-1000 µl.
Puntas para micropipetas.

REACTIVOS.

Equipo para diagnosticar sarampión.
Equipo para diagnosticar hepatitis C.

Fig 54. Diagrama de flujo de ELISA.



METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ^{1,3}.
ELISA PARA DIAGNOSTICAR SARAMPIÓN.
(SE DETECTAN ANTICUERPOS IgM.)

<ol style="list-style-type: none"> 1. En un tubo de ensayo diluir el suero 1:40 (5 µl de suero con 195 µl del diluyente), mezclar. En otro tubo mezclar 150 µl de suero diluido y 150 µl de solución absorbente, incubar 20 min a temperatura ambiente. 2. Colocar 100 µl de suero inactivado y absorbido a un pozo A y un pozo C. Agitar suavemente 15 seg. Incubar 20 min a temperatura ambiente. 3. Vaciar el contenido en recipiente con cloro, sacudir contra papel absorbente. 4. Lavar 3 veces con 300 µl de la solución de lavado, vaciar el contenido. 	
<ol style="list-style-type: none"> 5. Agregar 100 µl del conjugado a cada pozo. Agitar suavemente 15 seg, incubar 20 min a temperatura ambiente. 6. Vaciar el contenido en recipiente con cloro, sacudir contra papel absorbente. 7. Lavar 3 veces con 300 µl de la solución de lavado, vaciar el contenido. 	
<ol style="list-style-type: none"> 8. Agregar 50 µl de los substratos A y B a cada pozo. 	
<ol style="list-style-type: none"> 9. Agitar suavemente 15 seg. Incubar 10 min en la oscuridad. 10. Agregar 50 µl de la solución de paro a cada pozo. 	

11. La interpretación se lee de color amarillo indica prueba de ELISA (+) si es incolora (-).

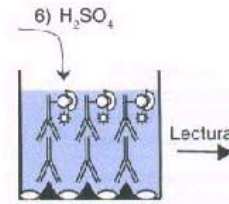
Fig 55. Resultado de la prueba de ELISA para sarampión.



**METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ^{1,3}.
ELISA PARA DIAGNOSTICAR HEPATITIS C.
(SE DETECTAN ANTICUERPOS IgG.)**

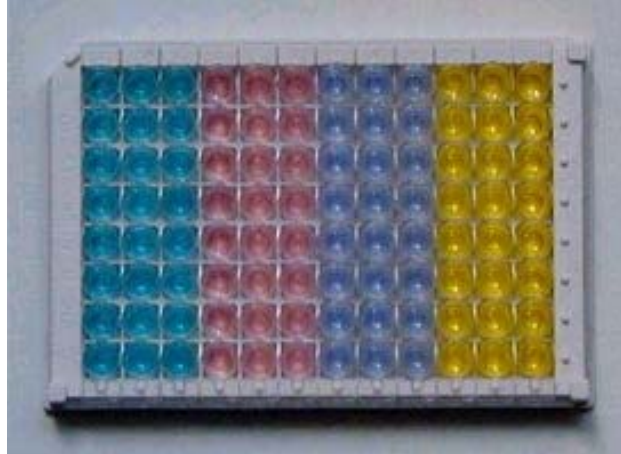
<ol style="list-style-type: none"> Colocar en un pozo 200 μl de diluyente de muestra y 10 μl de suero, mezclar suavemente durante 10 seg, incubar 30 min a 37 °C. Vaciar el contenido en recipiente con cloro, sacudir contra papel absorbente. Lavar 5 veces con 300 μl de la solución de lavado, vaciar el contenido. 	
<ol style="list-style-type: none"> Agregar a cada pozo 60 μl (1 gota) del conjugado. Mezclar durante 10 seg, incubar por 30 min a 37 °C. Vaciar el contenido en recipiente con cloro, sacudir contra papel absorbente. Lavar 5 veces con 300 μl de la solución de lavado, vaciar el contenido. 	
<ol style="list-style-type: none"> Agregar 50 μl (1 gota) de los substratos A y B a cada pozo. Incubar 30 min a temperatura ambiente. 	

9. Agregar 50 μ l (1 gota) de la solución de paro.



10. La interpretación se lee de color amarillo indica prueba de ELISA (+) si es incolora (-)

Fig 56. Resultado de la prueba de ELISA para hepatitis C.



PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ¹.

1. Realizar correctamente las diluciones en el suero.
2. Realizar de manera correcta la absorción del suero problema con el antígeno.
3. Escurrir la placa enérgicamente para eliminar los restos de soluciones.
4. Realizar los lavados como indica cada técnica de ELISA las veces que se necesiten para quitar impurezas que interfieran y den falsos (+) ó (-).
5. Colocar la cantidad indicada de sustratos recién preparados.
6. Agregar la solución de paro como indica la técnica con el mismo orden como se fueron llenando los pozos.
7. Toda la técnica de ELISA se debe realizar con estas precauciones si no las lecturas de la prueba dan resultados erróneos y se tendrán que repetir.
8. Tener cuidado al manipular antígenos absorbentes por que son haptenos patógenos a la salud como:
 - Ag de VIH.
 - Ag de Sarampión.
 - Ag de Hepatitis C.
 - Ag de Triquinella spiralis.
9. Para manipular los antígenos para prueba de ELISA utilizar guantes.

RESULTADOS.

Si se cuenta con un lector de ELISA el resultado (+) se asignara a la lectura mayor del valor de la densidad óptica en caso de no contar con el lector de ELISA será la lectura de manera visual.

Cuadro 29. Tabla de resultados de pruebas de ELISAS de sarampión y hepatitis C.

Equipo.	Sarampión.	Hepatitis C.

BIBLIOGRAFÍA.

1. AGUILAR TORRENTA FAVIOLA 2001. Manual del Curso Practico de Inmunología, 1ª edición, Editorial ENCB IPN, México DF, 204 pp.
2. MARGINI, RICARDO ANIBAL. 1996. Inmunología e Inmunoquímica. 5ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 976 pp.
3. ROJAS ESPINOSA, OSCAR. 2001. Inmunología (de memoria), 2ª edición, Editorial Panamericana. México, DF. 374 pp.

PRÁCTICA No 10

ELECTROFORESIS E INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Objetivo:

Realizar la separación de un Ag sometiéndolo a un campo eléctrico utilizando como soporte un gel de poliacrilamida.

Transferir las proteínas del gel hacia un papel de nitrocelulosa, con ayuda de un campo eléctrico, en cámara húmeda.

Realizar el reconocimiento de los antígenos, en el papel de nitrocelulosa, por medio de anticuerpos de sueros de pacientes y su posterior revelado con el uso de conjugados, sustratos y cromógenos.

INTRODUCCIÓN.

ELECTROFORESIS: Es un tamizado molecular a través de un gel de corrida. El tamaño del poro del gel desempeña un papel fundamental. En algunos geles, como los de agarosa, los poros son suficientemente grandes como para no retener a la mayoría de las moléculas proteínicas que migran, por lo que aquí la separación dependerá fundamentalmente de la carga neta de éstas. Además, dado que se trata de un producto natural, sus poros no son homogéneos, en el caso de los geles de poliacrilamida pueden conseguirse poros de diferentes diámetros según las condiciones de la polimerización; como consecuencia, para un gel de determinado poro, el tamaño molecular y la carga neta serán los factores determinantes de la separación de las moléculas de una mezcla (1).

Los geles de poliacrilamida resultan de la polimerización, en largas cadenas, de acrilamida monomérica ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}_2$) y de su entrecruzamiento con N-N-metilen bisacrilamida ($\text{CH}_2=\text{CH}-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}_2-\text{NH}-\text{CO}-\text{CH}=\text{CH}_2$), designada bisacrilamida. El poro del gel formado dependerá de las concentraciones relativas de ambos reactivos, durante la polimerización. La polimerización de la acrilamida necesita de un iniciador del proceso. Los más comúnmente usados son el persulfato de amonio y la riboflavina. Se añade, además, como catalizador, N,N,N',N'-tetrametil etilendiamina (TEMED). En el sistema persulfato de amonio-TEMED, este último cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato, lo que en definitiva inicia la polimerización. En este mecanismo interviene la base libre TEMED, por lo que la acidificación retarda la polimerización. Cuando se usa riboflavina, se requiere luz para iniciar la polimerización; ésta origina radicales libres mediante la fotodescomposición de la riboflavina. El oxígeno inhibe la polimerización; por lo que los reactivos a emplear deben ser previamente desgasificados (1).

El tamaño del poro del gel decrece a medida que la concentración de acrilamida total aumenta. Para una determinada concentración monomérica, el tamaño del poro dependerá del entrecruzamiento producido. Experimentalmente, la electroforesis en gel de poliacrilamida puede efectuarse en tubos ó en placas. En el primer caso se utiliza un cilindro de gel para cada muestra a analizar mientras que cuando se emplean placas, pueden correrse en forma simultánea, varias muestras. Este procedimiento resulta útil para separar proteínas de una mezcla, las que pueden ser aisladas cortando el gel y posteriormente eluidas. Si bien las cantidades recuperadas son pequeñas, muchas veces son suficientes para el análisis de algunas de sus propiedades o para usarlas como inmunogenos (1).

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede desarrollarse también usando soluciones amortiguadoras que contengan sustancias disociantes, en especial detergentes iónicos. Una de las más usadas es el dodecilsulfato de sodio (SDS). Las proteínas a analizar son hervidas a 100 °C en presencia de un exceso de SDS y 2-mercaptoetanol. En esas condiciones el tiol rompe los puentes disulfuro que pudieran existir y el

agente desnaturizante hace que la proteína se desdoble en sus polipéptidos constitutivos, los que fijan SDS en una relación constante (1.4 g de SDS por g de polipéptido). A causa de ello la carga intrínseca del péptido se hace insignificante ante el exceso de carga negativa del SDS; como consecuencia, la carga de todas las moléculas será prácticamente idéntica. Por lo que su desplazamiento en un campo eléctrico, en un gel de determinada porosidad, dependerá exclusivamente de su tamaño molecular. Este método, conocido como electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS o SDS-PAGE, permite por comparación con sustancias de peso molecular conocido que corren simultáneamente, determinar el peso molecular relativo de los productos en análisis. La electroforesis se utiliza en forma rutinaria para este fin y para ello se necesitan pequeñas cantidades de muestra (1).

La electroforesis en gel de poliacrilamida puede desarrollarse usando sistema de amortiguadores continuos o discontinuos. En el primer caso, los iones que constituyen la solución amortiguadora durante todo el recorrido de la muestra (gel separador) son los mismos y el pH es constante. En algunas situaciones sólo puede variar la concentración iónica en los vasos de contención o tanques. Cuando se usan estos sistemas, las muestras a analizar se siembran directamente en el gel separador. En los sistemas discontinuos, la solución amortiguadora de los geles y el de los tanques de los electrodos son diferentes. Normalmente el pH de ambas soluciones amortiguadoras es diferente. Las muestras a analizar se colocan en un gel de poro grueso (gel concentrador) con la solución amortiguadora Triz-HCl, con pH de 6.8, que se ha hecho polimerizar sobre el gel separador (pH de 8.8). La solución amortiguadora del recipiente que contiene el cátodo es Triz-glicina con pH de 8.3. Ello permite que volúmenes apreciables de muestras diluidas de proteínas puedan ser analizadas, ya que al ser sembrados en un gel de este tipo en el que los iones y el pH de las soluciones amortiguadoras son diferentes, las moléculas se desplazaran a través del gel y se concentraran en una zona estrecha, en el limite correspondiente al gel separador, previo a su separación en éste (1).

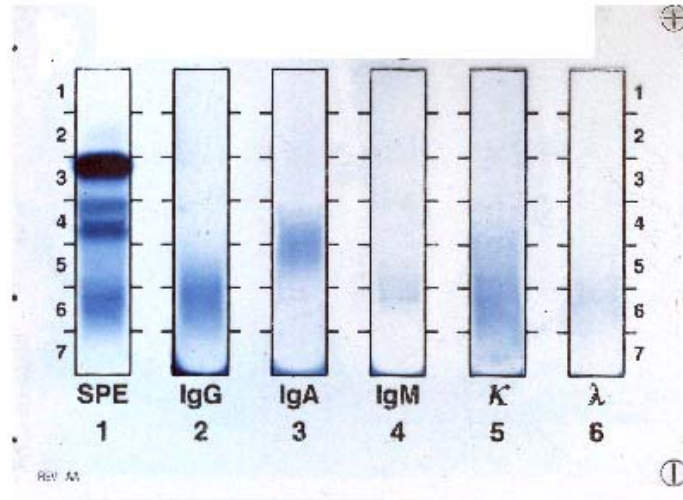
Al pH del gel concentrador y de la muestra (pH de 6.8), la glicina que forma parte de la solución amortiguadora del tanque catódico está muy poco disociada, ya que está muy próximo a su pKa, por lo que su movilidad en el campo eléctrico será reducida. Los iones cloruro, en cambio, a ese pH tendrán una mayor movilidad, dado su grado de disociación y la movilidad de las proteínas ocupará una posición intermedia. Al aplicarse un voltaje los iones cloruro migrarán alejándose de la glicina, dejando tras ellos una zona de menor conductividad, que es inversamente proporcional al campo de fuerza, esta zona genera un gradiente de mayor voltaje, que acelera la migración de la glicina hacia esta zona, aproximándose a los iones cloruro, y creando un estado de uniformidad en él que los productos de movilidad y gradiente de pH de ambos iones son iguales. Estos se mueven ahora a la misma velocidad, con un estrecho margen de separación entre ellos. Mientras se desplazan a través de la muestra y del gel concentrador, un gradiente de bajo voltaje se mueve antes que ellos y otro de alto voltaje, después. Cualquier proteína que se mueva por delante de la banda iónica es rápidamente atrapada ya que su movilidad es menor a la de los iones cloruro, pero mayor que la de la glicina (1).

Como consecuencia, la proteína, es concentrada en una banda delgada. Las diferentes proteínas se irán apilando, unas sobre otras, en una banda delgada por detrás de los iones cloruro y por delante de la glicina, acumulándose finalmente en el límite del gel separador. En este momento al aumentar el pH del gel separador: pH de 8.8, la glicina incrementa su disociación y su movilidad efectiva sobrepasa a la proteína y migra junto a los iones cloruro. Al mismo tiempo, al disminuir el tamaño del poro del gel, las moléculas proteínicas se movilizaran en una zona uniforme de gradiente de voltaje y pH, pero con un desplazamiento regulado por sus respectivas cargas y tamaños moleculares, lo que hace posible la separación de diferentes

especies moleculares dentro de una mezcla. En el caso del SDS-PAGE, la carga neta de las diferentes moléculas es prácticamente la misma, por lo que la separación será sólo por tamaño molecular (1).

TINCIÓN CON AZUL DE COOMASSIE: este colorante permite detectar de 0.2 a 0.5 mg de cualquier proteína en una banda fina. Dado que el colorante es preparado en una solución con ácido acético, la fijación de las proteínas y su coloración ocurren en el mismo momento (1).

Fig 57. Tinción con azul de Coomassie de geles SDS-PAGE.

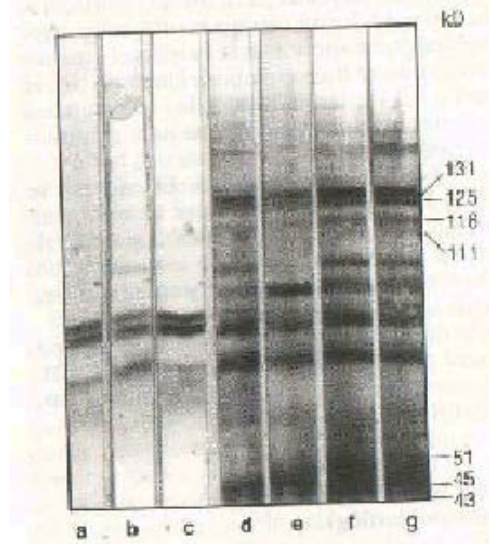


INMUNOELECTROTRANSFERENCIA: Es la transferencia de componentes separados mediante electroforesis a otro en el que los componentes pudieran tener una unión más firme al soporte, como lo son las membranas de nitrato de celulosa. En este caso la transferencia se hace por simple contacto del gel de agarosa, en el que se ha realizado la separación electroforética, con la membrana de nitrato de celulosa. Los productos fijados a ella se identifican por tinción directa (1).

Poco tiempo después fue descrita, para sustancias antigénicas, una técnica similar a la anterior en la que los componentes de una mezcla, separados por SDS-PAGE, son transferidas a las membranas de nitrato de celulosa mediante el paso de corriente eléctrica, a un pH elevado. Como consecuencia, las moléculas proteínicas se movilizan y contactan con la membrana de nitrato de celulosa, donde se fijan. Las moléculas antigénicas transferidas son identificadas por interacción con anticuerpos específicos. Los complejos Ag-Ac formados pueden ser identificados desarrollando, sobre el complejo formado, una reacción colorida semejante a ELISA. La identificación de antígenos, en la forma descrita, se denomina inmunoelectrotransferencia (1).

En cuanto a las membranas empleadas hay varios tipos, aunque la de nitrocelulosa es la más utilizada. La unión de los antígenos a la nitrocelulosa se debe fundamentalmente a interacciones de tipo hidrofóbico. Las membranas de nitrocelulosa de un tamaño de poro de 0.45 μm es la más empleada para la mayoría de los propósitos, aunque polipéptidos de bajo PM pueden traspasarla sin unirse, lo que puede ser solucionado con membranas de 0.1 μm de poro. Una desventaja de la nitrocelulosa es su baja capacidad de unión, cerca de 80 $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ (1).

Fig 58. Bandas de precipitación en papel de nitrocelulosa.



En cuanto las soluciones amortiguadoras para la transferencia, la más utilizada contiene 25 mM de trizma base, 192 mM de glicina a un pH de 8.3, el agregado de metanol previene el hinchamiento del gel durante la transferencia y aumenta la unión de las proteínas a la membrana, aunque reduce la eficiencia de elusión de las proteínas del gel (1).

Si las moléculas transferidas van a ser identificadas con un antisuero, un anticuerpo monoclonal o algún otro marcador es importante bloquear los sitios libres de la membrana para evitar uniones inespecíficas de estos marcadores. Los bloqueadores utilizados dependen del tipo de membrana y de la sensibilidad del sistema empleado. Es importante recordar que estos bloqueadores no deben tener reactividad cruzada con ninguno de los reactivos utilizados en las etapas posteriores. En general puede emplearse cualquier tipo de proteína ó mezcla de proteínas que resulten inertes en el sistema. Por ser barata y accesible, la leche descremada es muy utilizada, además se obtienen bajas señales de fondo. Una concentración adecuada sería de 0.5%. Se ha comprobado que concentraciones mayores (1-3%) pueden producir que las proteínas unidas a la membrana se despeguen. Los detergentes no-iónicos pueden también utilizarse como bloqueadores, pero su mayor desventaja consiste en que producen una considerable pérdida de proteínas y las señales de fondo tienden a ser más altas. En el caso de utilizar membranas catiónicas, dada su mayor capacidad de unión, se necesitan condiciones más estrictas para el bloqueo, con concentraciones más altas del bloqueador y tiempos y temperatura de incubación mayores (1).

Las proteínas transferidas son comúnmente analizadas con Ac específicos, policlonales o monoclonales. En el caso de Ac policlonales pueden utilizarse como antisueros o como Ac purificados; esto último es aconsejable en el caso de que existan problemas de unión inespecífica. Además puede utilizarse cualquier otro marcador que se una específicamente a las moléculas en estudio, por ejemplo: lectinas para detectar glucoproteínas, hormonas para la detección de receptores, etc. (1).

El primer Ac o marcador puede estar en la misma solución utilizada para el bloqueo, para prevenir adsorciones inespecíficas a la membrana. En cuanto a los conjugados enzimáticos usados como Ac secundarios, las enzimas más utilizadas son la peroxidasa del rábano picante y la fosfatasa alcalina. Los cromógenos en estos casos son 4-Cloro-1-naftol y nitro azul de tetrazolio (NBT), respectivamente. El primero es considerado no carcinogénico y de bajas señales de fondo sin pérdida de la sensibilidad. Estos cromógenos dan productos insolubles, que precipitan en el sitio de producción y permanecen unidos a la

membrana. Las ventajas de los conjugados enzimáticos son la finalidad de manejo y almacenamiento y el rápido desarrollo de color. La sensibilidad está en el rango de 0.1 a 10 ng de antígeno por banda, dependiendo del sistema. Para evaluar la transferencia a la membrana es aconsejable hacer una tinción no específica de las proteínas luego de la transferencia. El colorante que puede emplearse es el rojo de Ponceau S, ya que tiene la propiedad de teñir en forma reversible, y realizarse posteriormente la reacción inmunoenzimática, dado que durante la incubación con la solución de bloqueo se produce la decoloración. Esto permite identificar las distintas muestras transferidas, para poder cortar en forma separada cada una de ellas si se desea incubar con distintos Ac o marcadores (1).

ELECTROFORESIS.

PREPARACIÓN DEL GEL DE POLIACRILAMIDA.

MATERIAL.

2 cristales.
 Un juego de 3 separadores.
 Peine.
 Pinzas.
 Fuente de poder.
 Cámara de electroforesis.
 Pipeta.
 2 viales.
 1 matraz Erlenmeyer.
 1 propipeta.
 1 pipeta Pasteur.
 1 triangulo de porcelana.
 1 tripie.
 Tela de asbesto.
 Mechero.

REACTIVOS.

TEMED.
 SDS al 10%.
 Acrilamida y Bisacrilamida: 30:1.
 Persulfato de amonio al 10%.
 Solución reguladora TRIZ-HCl con pH = 6.8 y pH = 8.8.
 Agar noble al 1%.
 Agua destilada.
 Solución reguladora de corrimiento.

TRATAMIENTO Y PREPARACIÓN DE LAS MUESTRAS.

MATERIAL.

Tubos ependorf.
 Tripie.
 Tela de asbesto.
 Mechero.
 Micropipetas.
 Puntas para micropipetas.
 1 vaso de precipitados de 500 ml.
 Gradilla de unicel para colocar muestras.
 Baño María.

REACTIVOS.

Solución reguladora de muestra:
 Glicina, SDS, Triz-HCl pH = 8.8 y Cristales de bromofenol.
 Marcadores de peso molecular.
 Muestras a separar.
 *Opcional
 2 mercaptoetanol.
 Urea ó enzimas.

MATERIAL PARA TEÑIR.

MATERIAL.

Recipiente hermético.
 Agitador, embudo y un tripie.
 Triangulo de porcelana.
 2 vasos de precipitados de 200 ml.

REACTIVOS.

Azul de Coomassie:
 Solución decolorante I.
 Solución decolorante II.
 Carbón activado.

MATERIAL PARA LECTURA DEL GEL.

MATERIAL.

Transluminador.
Regla.

REACTIVOS.

Gel de poliacrilamida.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

MATERIAL.

Cámara de transferencia.
Fuente de poder.
Cartucho para transferir que contiene:
2 esponjas.
2 pedazos de papel filtro.
Papel de nitrocelulosa.
Pipeta.
Pinzas y Bisturí.
Regla.

REACTIVOS.

Regulador de transferencia.
Rojo de Ponceau.

MATERIAL PARA BLOQUEAR EL GEL.

MATERIAL.

Bisturí y Pinzas.
Caja hermética.
Refrigerador a 4 °C.

REACTIVOS.

Solución bloqueadora:
albúmina 1%, gelatina, glicina ó leche
descremada.

MATERIAL PARA LA INMUNODETECCIÓN.

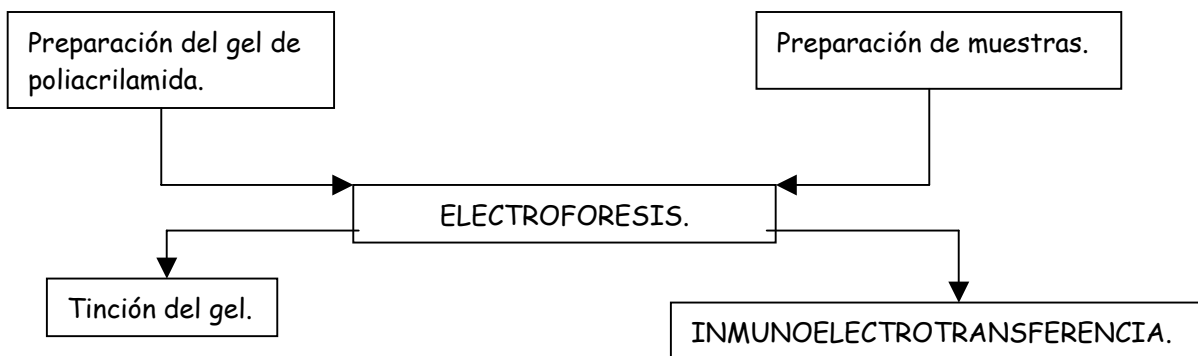
MATERIAL.

Placa de pozos para tiras de papel de nitrocelulosa.
Pipetas.
Agitador.
Pinzas.

REACTIVOS.

Tiras de papel de nitrocelulosa.
Sueros de diferentes pacientes.
Solución de lavado: PBS-tween.
Sustrato para la enzima.

Fig 59. Diagrama de flujo de electroforesis e inmunoelectrotransferencia.



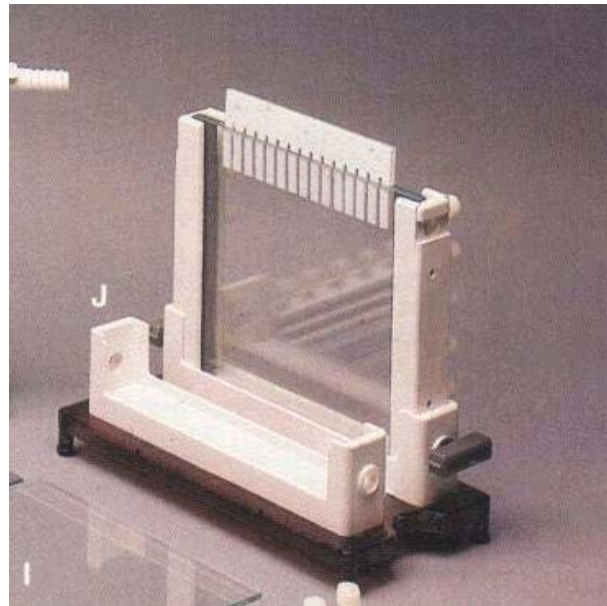
METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ^{2,3}.

ELECTROFORESIS.

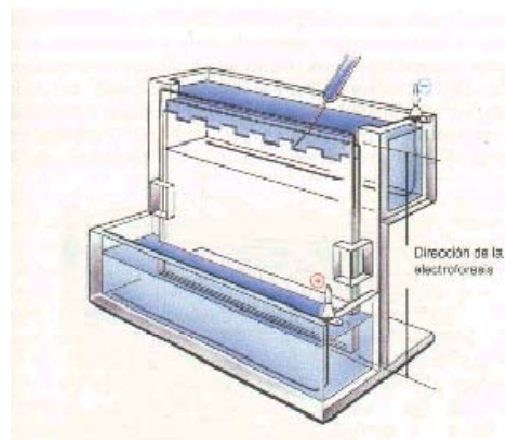
1. Preparación del agar al 2.5% en agua, fundido en baño en agua caliente.
2. Ensamblar cámara de electroforesis con separadores para el grosor del gel.
3. Sellar las partes laterales y la parte inferior de la cámara con agar y dejar secar.



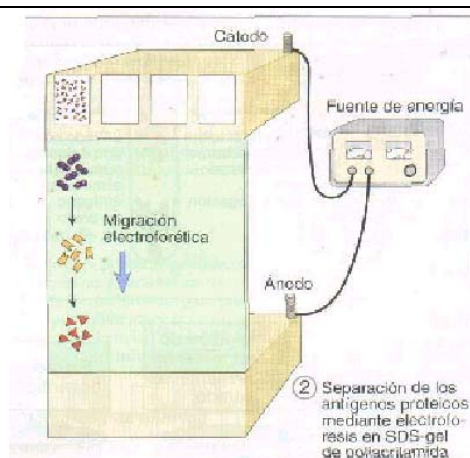
4. Preparar el gel separador, la concentración y el tamaño del poro dependerá de la cantidad de reactivos mezclando de la siguiente manera: Acrilamida/Bisacrilamida, Trizma base
pH = 6.8, Agua y SDS.
El Persulfato de Amonio y el TEMED, se agregan a la mezcla anterior justo antes de vertirlo en la cámara de electroforesis.
5. Probar con agua si hay fugas en la cámara.
6. Vertir el gel hasta una altura de aproximadamente 75% de la cámara, cubrir con 300 μ l de isopropanol, dejar gelificar y desechar el isopropanol.
7. Preparación del gel concentrador, en forma semejante al gel separador.
Acrilamida/Bisacrilamida, Trizma base
pH = 8.8, Agua y SDS.
El Persulfato de Amonio y el TEMED se agregan a la mezcla anterior justo antes de vertirlo en la cámara de electroforesis.



8. Llenar con gel concentrador en la parte superior de la cámara de electroforesis y colocar el peine para formar los carriles.
9. Preparación de muestras:
 - a) En tubos ependorf se colocan de 20 a 30 μ l de la muestra a separar y se agrega solución reguladora de muestra.
 - b) Hervir 3 min en baño María.
10. Llenar los tanques superior e inferior con la solución de corrimiento.
11. Colocar las muestras en los micropozos en forma individual y con sumo cuidado con micropipeta y colocar un marcador de peso molecular.



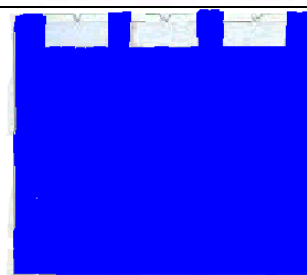
12. Conectar los cables de la corriente eléctrica en los polos correspondientes.



13. Prender la fuente de poder a 100 volts, dejar correr de 3 a 6 hrs hasta que halla separación total de los antígenos.
14. Una vez terminada la electroforesis desmontar la cámara y retirar el gel.

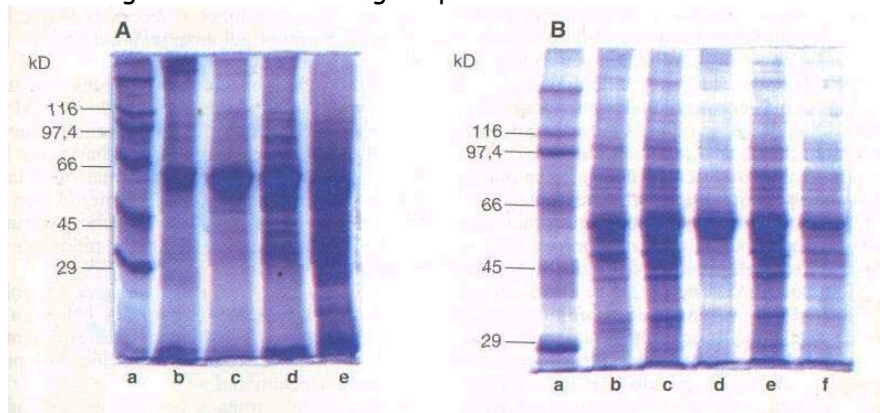


- *Si se procede sólo la lectura de electroforesis.
15. Se pone a teñir el gel con azul de Coomassie.



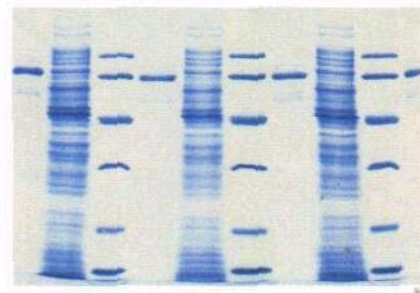
16. Desteñir el gel con el decolorante I (Ácido acético, metanol y agua.), se deben observar bandas de antígeno proteínico reveladas.

Fig 60. Bandas de antígeno proteínico en una electroforesis.



INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

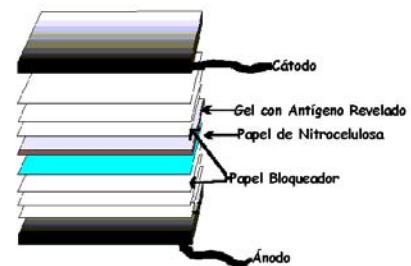
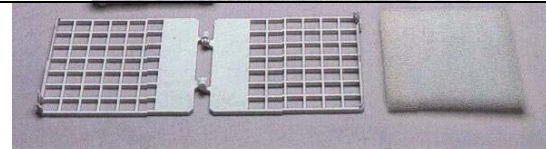
1. Una vez terminada la electroforesis, desmontar la cámara, retirar el gel.



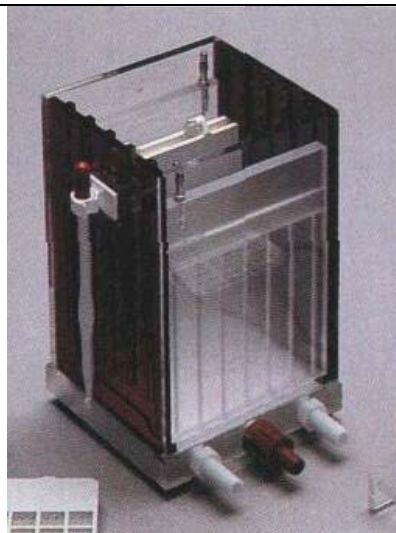
2. Sacar un cartucho de la cámara de electrotransferencia.



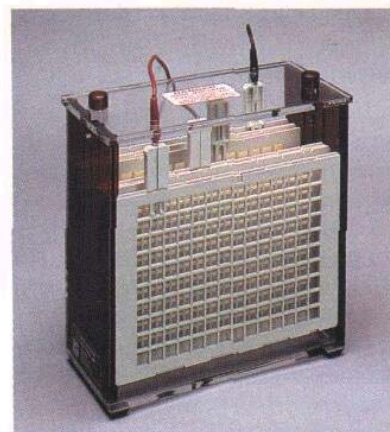
3. Abrir el cartucho y en el lado izquierdo colocar el gel sobre la esponja y en el lado derecho colocar un corte de papel de nitrocelulosa, luego cerrar sobre el gel.



4. Vertir la solución amortiguadora de transferencia en la cámara de electrotransferencia hasta el 85%.
5. Colocar el cartucho en su lugar.



6. Cerrar la cámara y encender la fuente de poder a 125 mA, por 1 hr.



7. Teñir el papel de nitrocelulosa con rojo de Ponceau para comprobar si se realizó la electrotransferencia.
8. Decolorar con agua destilada, incubar con la solución bloqueadora.
9. Cortar el papel de nitrocelulosa en tiras de 3 a 5 mm de ancho.



Colocar las tiras de papel de nitrocelulosa en la placa con carriles para tiras de papel.

10. Incubar las tiras de papel, con los sueros problema diluidos, por 2 hrs a temperatura ambiente ó toda la noche en refrigeración.

11. Lavar 10 veces, con la solución de lavado, por 1 min cada vez.

12. Incubar las tiras de papel, con el Ac Anti-Ig, por 2 hrs a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración.

13. Lavar 10 veces con la solución de lavado, por 1 min cada vez.

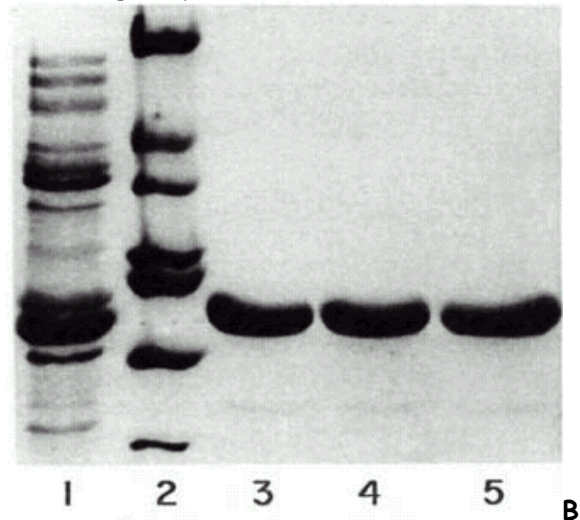
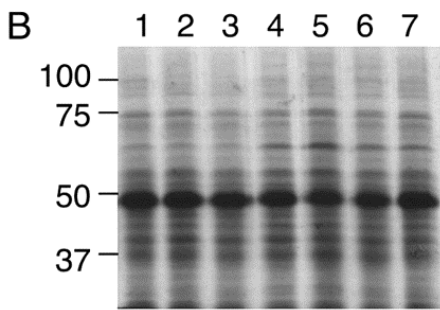
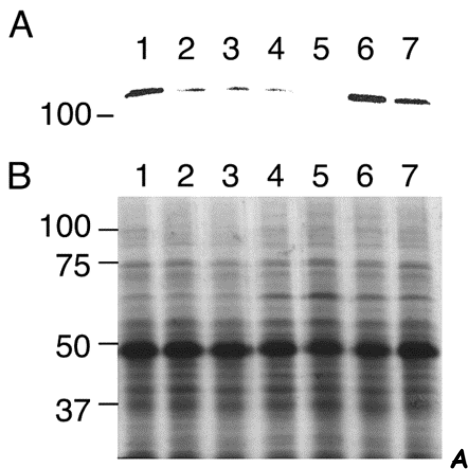
14. Incubar las tiras de papel, con el conjugado, por 2 hrs a temperatura ambiente o toda la noche en refrigeración.

15. Lavar 10 veces con la solución de lavado, por 1 min cada vez.

16. Incubar las tiras con el sustrato-cromógeno hasta la aparición de las bandas.



Fig 61. Bandas de precipitación Ag-Ac patrón.



PRECAUCIONES EN LA TÉCNICA ^{2,3}.

ELECTROFORESIS.

1. La cámara de electroforesis debe quedar bien ensamblada y bien sellada con el agar, si no puede haber fugas.
2. Debe prepararse correctamente el gel separador y vertirlo con cuidado y en forma uniforme en la cámara de electroforesis, si no incluso se puede fragmentar y habrá que repetir todo el procedimiento.
3. El gel concentrador se debe preparar correctamente, si no se pueden estancar las muestras en los micropozos y el corrimiento de proteínas es deficiente.
4. La fuente de poder no debe correr por arriba de 100 volts por que no habrá buena una separación y será deficiente y no sirve para lectura o electrotransferencia.
5. Cuando se este realizando la electroforesis no meter la mano ni tocar con los dedos la solución amortiguadora de corrimiento ya que se puede recibir una descarga eléctrica.
6. Una vez terminada la electroforesis desprender con cuidado el gel si se realiza en forma brusca se fragmenta y no manipularlo con la mano sino con pinzas.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

1. Manipular con delicadeza el gel y cortar el papel de nitrocelulosa con la respectiva medida.
2. Cerrar el cartucho acrílico con cuidado y sobre del lado del gel, sino se puede fragmentar.
3. No poner exceso de solución amortiguadora de transferencia por que al momento de conectar la corriente puede que la transferencia de proteínas al papel sea brusca y entonces será deficiente.
4. Al terminar la electrotransferencia, sacar el cartucho acrílico abrir y despegar el papel con sumo cuidado.
5. Manipular el papel con pinzas.
6. Cortar el papel húmedo, en tiras, con bisturí y con cuidado
7. Realizar los pasos de la inmunodetección sin tocar las tiras de papel y al volcar la placa de carriles se realiza en forma de canto sino se pueden caer las tiras de papel y se pueden estropear, dando la lectura falsos (+) ó (-).
8. Realizar los pasos de la inmunodetección en forma ordenada, sino; puede haber falsos (+) ó (-).

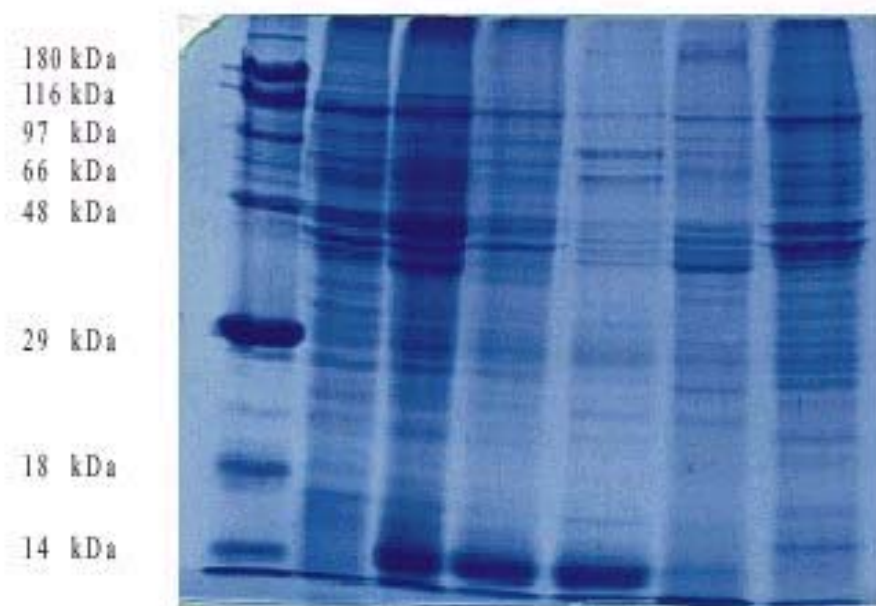
Cuadro 30. Riesgo de los reactivos de la práctica No 10

	SALUD	INFLAMABILIDAD	REACTIVIDAD	CONTACTO	EPP	ALMACENAJE
Acrilamida/Bis acrilamida	3	0	2	3	D	AZUL
Metanol	3	3	1	3	C, Eb	ROJO
Ácido acético.	3	2	2	4	C, Eb	ROJO
Azul de Coomassie	2	1	0	2	A	VERDE
SDS	1	0	1	2	A	VERDE
TEMED	2	4	1	2	C, Eb	ROJO
Trizma base	1	1	1	2	A	VERDE
Persulfato de amonio	1	0	3	2	B	AMARILLO
Glicina	1	1	0	0	A	VERDE
Albúmina	0	1	0	1	A	VERDE

RESULTADOS.

ELECTROFORESIS.

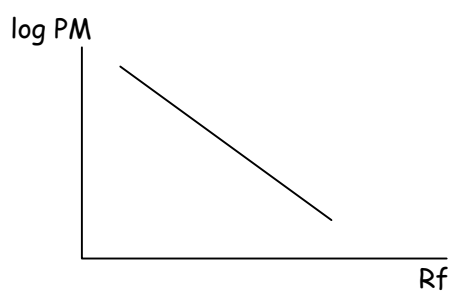
Fig 62. Separación electroforetica de las bandas del antígeno proteínico en el gel.



Se calcula el Rf de cada proteína con la siguiente formula:

$$Rf = \frac{\text{distancia recorrida de la muestra}}{\text{distancia de frente del colorante}}$$

se calcula el PM de cada proteína sacando log PM y se construye una curva patrón:

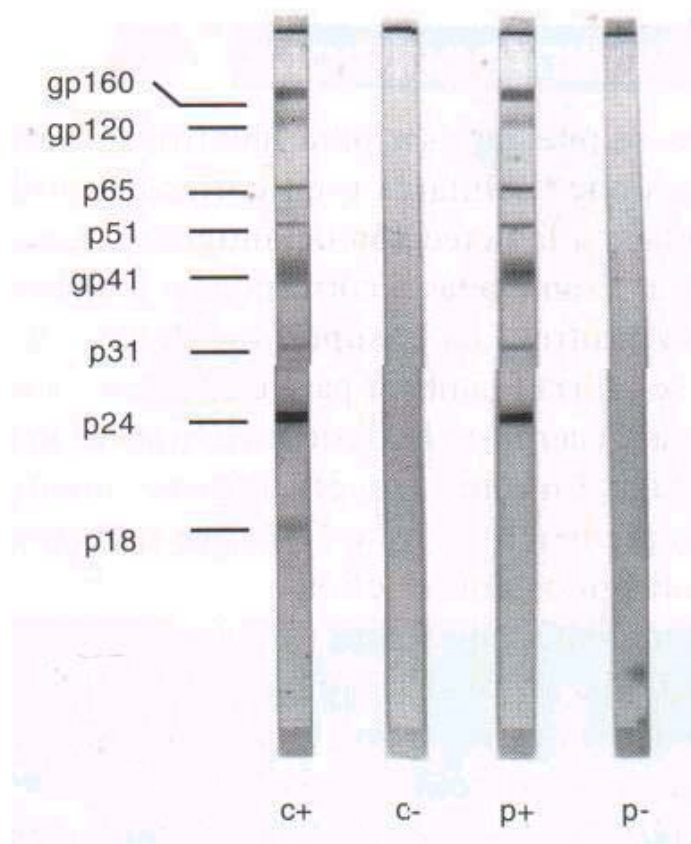


Con la curva patrón se conoce el PM de las proteínas por interpolación.

RESULTADOS.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA.

Fig 63. Revelado de las bandas del complejo Ag-Ac por transferencia e inmunodetección.



Los marcadores de peso molecular contenidos en el extremo del papel de nitrocelulosa teñidos con negro de amida sirve para construir una curva patrón como se realizo en el caso del gel para compararlo con las bandas de corrimiento con los que fueron reveladas con inmunodetección e interpolar los valores de estas últimas en la curva patrón.

BIBLIOGRAFÍA.

1. MARGINI, RICARDO ANIBAL. 1996. Inmunología e Inmunoquímica. 5ª edición. Editorial Panamericana. Buenos Aires, Argentina. 976 pp.
2. LAEMMLI, V.K. 1970. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head Bacteriophage Nature . 227: 680-685 pp.
3. TOWBIN. H. STAHEHELIN, T, GORDON. 1979. Electrophoretic Transfer of Proteins from Polyacrylamide Gels to Nirtocellulose-Sheets; procedure and some applications, proc, Nat, Acad. Sci, USA, 76 (9): 4350-4354 pp.

PRÁCTICA No 11

CITOMETRÍA DE FLUJO.

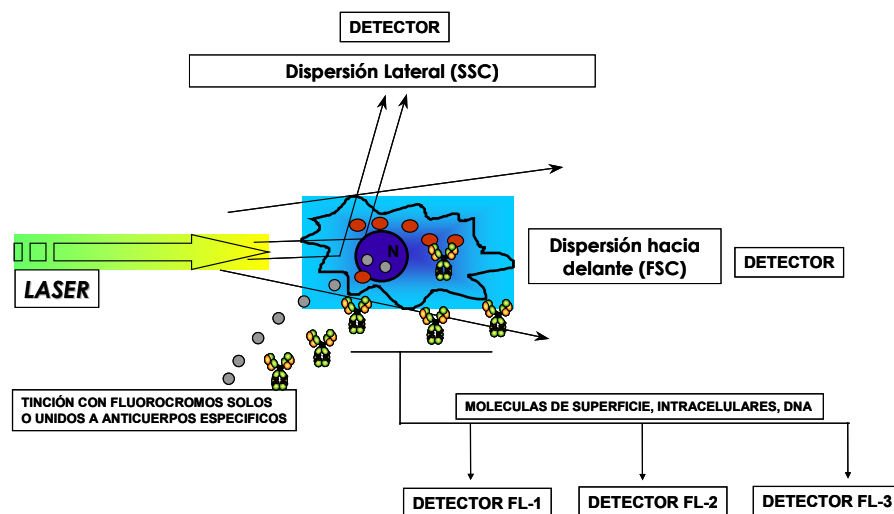
Objetivo:

Conocer la técnica de citometría de flujo (CMF) como una herramienta inmunológica de investigación y diagnóstico y los fundamentos de su funcionamiento para evaluar la respuesta inmunitaria.

INTRODUCCIÓN.

La citometría de flujo es una técnica que permite la medición simultánea de diversas características fenotípicas de células u otras partículas biológicas. Para la lectura por CMF, las células son teñidas con fluorocromos libres o acoplados a anticuerpos específicos que se unen a un constituyente celular y son analizadas en un equipo denominado citómetro de flujo. Las células son inyectadas en un flujo líquido y pasan una a una por un punto donde son analizadas con luz de alta intensidad (láser). Cada célula en el punto de interacción produce una señal fluorescente que es de intensidad proporcional a su contenido en un fluorocromo. Uno o varios detectores recogen la fluorescencia emitida y transforman la señal a pulsos eléctricos. También se recoge la luz dispersada por la célula, con lo cual se obtiene información acerca del tamaño, forma, y estructura de la misma. A diferencia de otras técnicas, el citómetro de flujo mide características celulares individuales de un gran número de células (no una media de los resultados), y además permite medir características de poblaciones en muestras heterogéneas (1,5).

Fig 64. Esquema general de las características que se pueden medir por CMF.

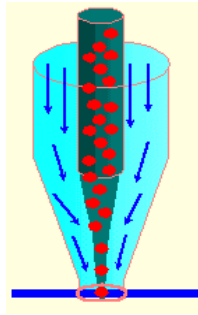


El citómetro de flujo consta de tres sistemas para la detección de las características celulares: sistema óptico, sistema de fluidos y sistema electrónico.

El sistema óptico: consiste generalmente en un rayo láser con fuente de argón que genera una radiación de 488 nm con la cual se excitan los fluorocromos utilizados. La luz que no es emitida o dispersada por las células se elimina por medio de filtros los cuales además la separan de acuerdo a la intensidad de emisión.

Sistema de fluidos: consiste en una cámara de flujo hidrodinámica que permite que solo una célula pase a la vez por el haz de luz láser. (ver figura 65).

Fig 65. Imagen del haz de luz láser.



Sistema electrónico: consiste en un sistema de detectores que captan la señal eléctrica de la emisión, la amplifican y la transforman en una señal electrónica que es visualizada como un punto en la computadora. Existen dos tipos de detectores de la luz: los fotomultiplicadores y los fotodetectores diodos o de estado-sólido.

Fotomultiplicadores (PMT): se usan para la detección de la señal de fluorescencia (emitida por los fluorocromos) y luz dispersada a 90 grados (que es una medida de la granularidad o complejidad interna de las partículas analizadas).

Fotodetectores diodos: se usan para detectar la dispersión frontal de la luz (que es indicativa del tamaño relativo de la partícula). Son muy resistentes y eficientes (señales fuertes), pero tiene una baja relación señal/ruido lo que los hace poco útiles para señales débiles (5).

Impacto de la Inmunología en la Técnica de CMF.

En la mayoría de las técnicas de diagnóstico e investigación actuales la inmunología constituye una poderosa herramienta. La CMF es un magnífico ejemplo ya que aprovecha la especificidad de los anticuerpos para estudiar propiedades funcionales y estructurales de células u otras partículas. En una célula se puede analizar por CMF su tamaño relativo y la complejidad interna de la misma lo que nos permite diferenciar poblaciones celulares, pero para diferenciar poblaciones con un mismo tamaño y granularidad (por ejemplo para diferenciar entre linfocitos T CD4+ y linfocitos T CD8+ en pacientes VIH positivos) se requiere el uso de anticuerpos monoclonales (AcMo) específicos marcados con fluorocromos (2).

En el ejemplo anterior, a una muestra de sangre se le adiciona un AcMo anti-CD4+ marcado con un fluorocromo y simultáneamente se le adiciona un Ac.Mo anti-CD8+ marcado con otro fluorocromo diferente, de esta manera podemos visualizar los porcentajes de cada población celular en la muestra (2).

El fluorocromo absorbe la energía del láser. Después libera esa energía como calor y emite fotones (luz) a una mayor longitud de onda. La cantidad de fluorocromo que se une a una célula es proporcional al número de sitios de unión. Hay dos modo de uso: 1) unión covalente del fluorocromo a moléculas (generalmente anticuerpos como en el ejemplo) que se unen específicamente a componentes celulares, y 2) fluorocromos que varían sus características en función del microambiente que les rodea (como ejemplo el Yoduro de propidio se une al DNA y permite hacer estudios de ciclo celular y apoptosis) (2).

Los fluorocromos mas usados acoplados a anticuerpos son los siguientes:

isotiocianato de fluoresceína (**FITC**). Se lee en el canal de fluorescencia **FL1**: excitación a 488 nm, emisión a 515 nm.

R-ficoeritrina (**PE**). Se lee en el canal de fluorescencia **FL2**: excitación a 488 nm, emisión a 585 nm.

peridinin clorofil-proteína (**PerCP**). Se lee en el canal de fluorescencia **FL3**: excitación a 488 nm, emisión a 670 nm.

MATERIAL.

Citómetro de Flujo.

Computadora con equipo para el citómetro de flujo.

Tubos para CMF.

REACTIVOS.

Muestra (sangre, medula ósea u otros fluidos biológicos).

Fluorocromos libres o acoplados a anticuerpos monoclonales específicos.

METODOLOGÍA DE LA TÉCNICA ^{2,3,4.}

PROCESAMIENTO DE LAS MUESTRAS:

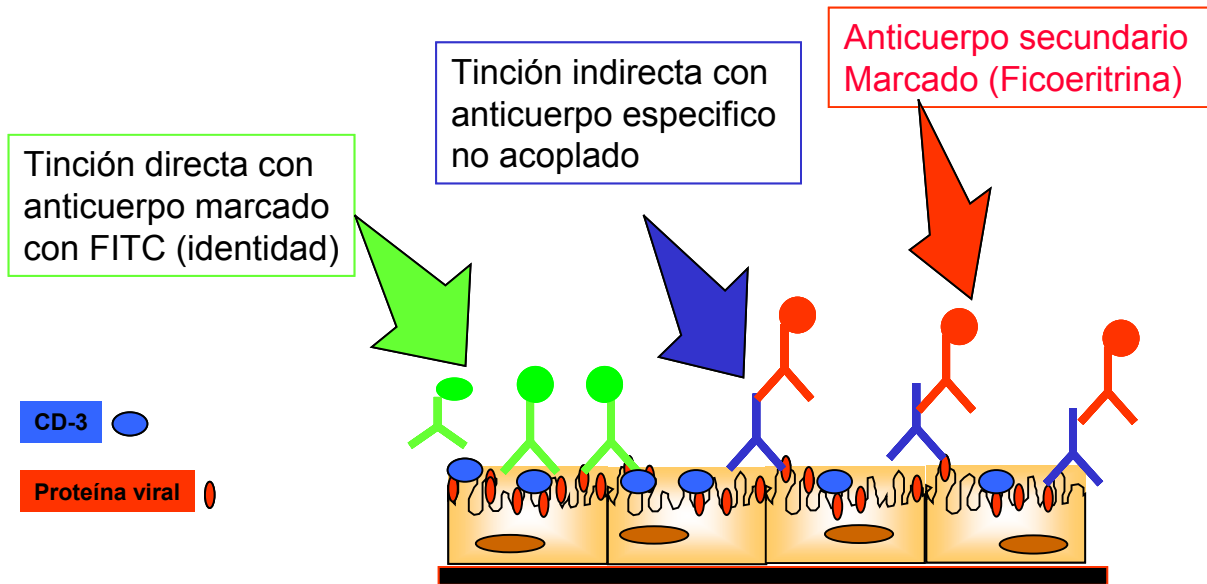
Debido a las especiales características de los citómetros de flujo, la muestra a analizar debe encontrarse en forma de suspensión monodispersa. La tinción con los fluorocromos se puede hacer directamente sobre muestras como la sangre periférica, medula ósea, u otros fluidos biológicos; pero en cambio los tejidos sólidos o muestras parafinadas necesitan de una disgregación más o menos intensa (mecánica, enzimática, etc.).

En ocasiones puede ser conveniente ó necesario enriquecer la concentración celular en la muestra antes de su procesamiento por citometría, ya sea para obtener una concentración celular adecuada para la incubación con los reactivos, o para acelerar el proceso de sorting (separación de subpoblaciones celulares). Lo anterior se logra generalmente obteniendo células mononucleares por Ficoll-Hypaque o por purificación magnética de una población específica.

Un factor limitante común en citometría de flujo es la disponibilidad de una suspensión celular, para estudiar sus características y relacionar o extrapolar sus resultados a fenómenos "in vivo". Para ello la suspensión celular debe cumplir una serie de requisitos: (1) representatividad del tejido, (2) suspensiones celulares de alta calidad, con pocos agregados, debrís, y bajo coeficiente de variación (CV), (3) preservación de las características celulares, y (4) suficiente muestra celular.

El proceso de tinción de las muestras es muy variado dependiendo de las características a evaluar. Para el caso de tinciones con anticuerpos específicos marcados, estos se adicionan por 15 min y después se realiza un lavado con solución amortiguadora, las células se resuspenden en una solución fijadora y se analizan en el citómetro de flujo. Otra variante es tener al anticuerpo específico sin marcar y después de la incubación y el lavado se adiciona un segundo anti-anticuerpo el cual va marcado. En la figura 66 se presenta un ejemplo de una tinción doble en la que se determina de manera directa la identidad celular con un anticuerpo anti-CD3 FITC (específico de linfocitos T) y de manera indirecta (con un segundo anticuerpo anti IgG-PE) la presencia de una proteína viral presente en la membrana de una célula infectada.

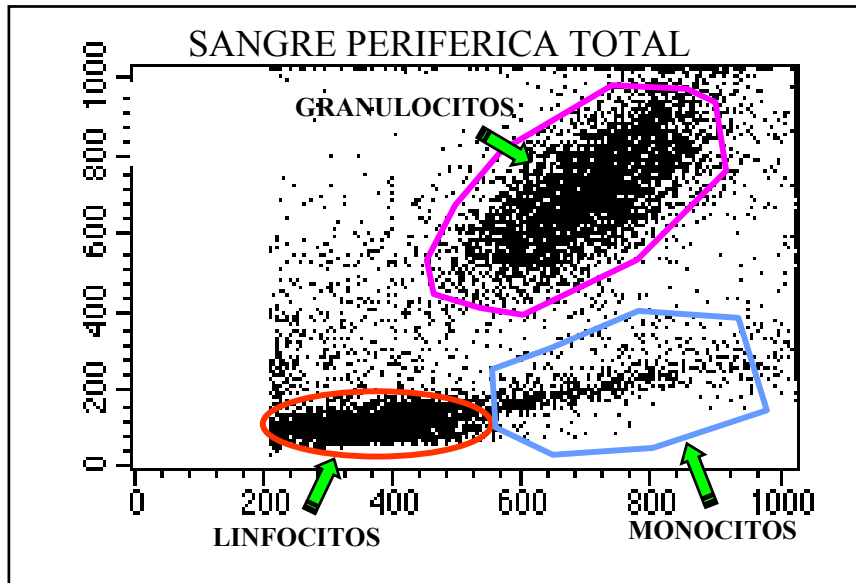
Fig 66. Doble tinción con anticuerpos monoclonales.



RESULTADOS.

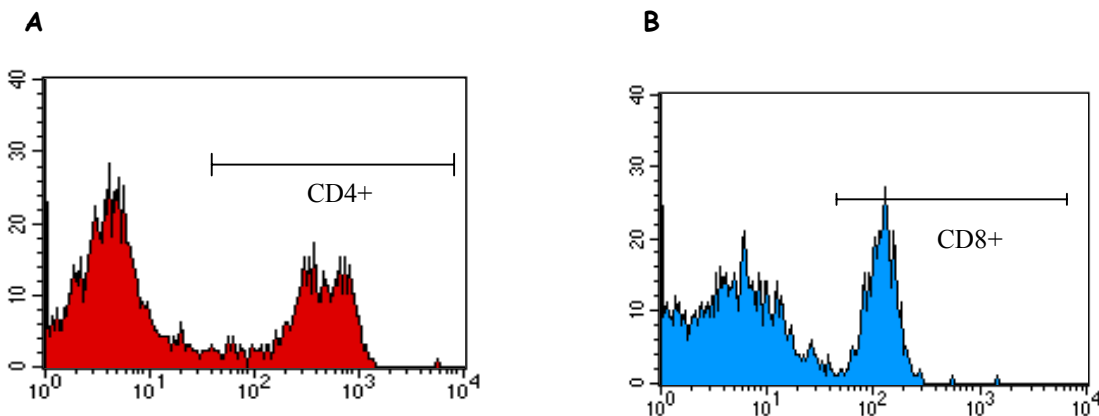
El citómetro de flujo está acoplado a un programa que genera gráficas para el análisis de los resultados obtenidos. Una de las gráficas que se deben generar es la que relaciona el tamaño y la granularidad de las partículas analizadas, esta información es muy útil ya que nos permite seleccionar y estudiar por separado a una subpoblación en particular y también delimitar las regiones de interés. Se tomó una muestra de sangre periférica y se realizó una tinción con un anticuerpo anti-CD4+ FITC (para identificar linfocitos T cooperadores CD4+) y un anticuerpo anti-CD8+ PE (para identificar linfocitos T citotóxicos CD8+), después de 15 min de incubación para que se lleve a cabo la reacción entre el anticuerpo y el marcador de superficie, se lavaron las células y se procedió a lisar a los eritrocitos con una solución hipotónica comercial; las células fueron resuspendidas en PBS y analizadas en el citómetro. La figura 67 muestra un ejemplo de este tipo de gráficas la cual fue generada en el programa Cell quest de un citómetro Becton-Dickinson.

Fig 67. Poblaciones de células de sangre periférica que se pueden observar en una gráfica de granularidad contra tamaño en el citómetro de flujo.



A partir de la gráfica anterior se puede seleccionar solo una de las poblaciones de interés para analizar otras propiedades de las células. En la figura 68 se muestran dos histogramas generados a partir de la región de linfocitos de la grafica anterior, en el histograma 68-A se observa el porcentaje de células de esta región que son positivas al marcador CD4+ y en el histograma 68-B las positivas al marcador CD8+, mediante el uso de estos gráficos podemos diferenciar a subpoblaciones que tienen el mismo tamaño y granularidad como en este caso se diferencio entre linfocitos T cooperadores y linfocitos T citotóxicos.

Fig 68. Histogramas generados a partir de la región de linfocitos de la gráfica de tamaño contra granularidad en la que se observan las poblaciones positivas al marcaje con anticuerpos específicos contra los marcadores de fenotipo A) CD4+ y B) CD8+.

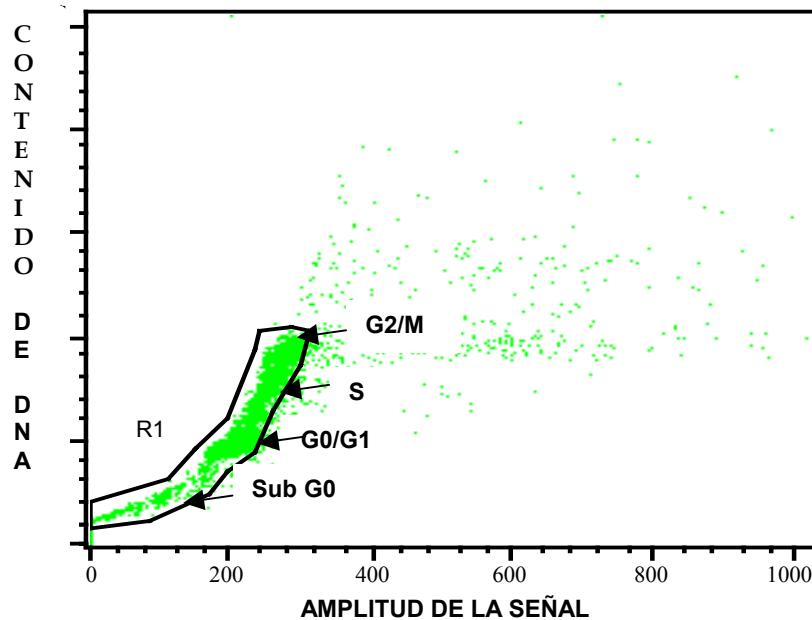


Determinación de las fases del ciclo celular por CMF.

Una aplicación importante de la CMF es que nos permite analizar las fases del ciclo celular mediante una técnica muy simple en la que se tiñen las células con yoduro de propidio (IP) (colorante fluorescente que se intercala en el DNA de doble cadena) y se analizan con el uso del canal 2 (FL-2) del equipo. Para este tipo de análisis se le pide al equipo que genere una gráfica de la amplitud de la señal del canal 2 (denominado FL-2W) contra el área de cada célula que incorpore el IP (denominada FL-2A) y que corresponde a la

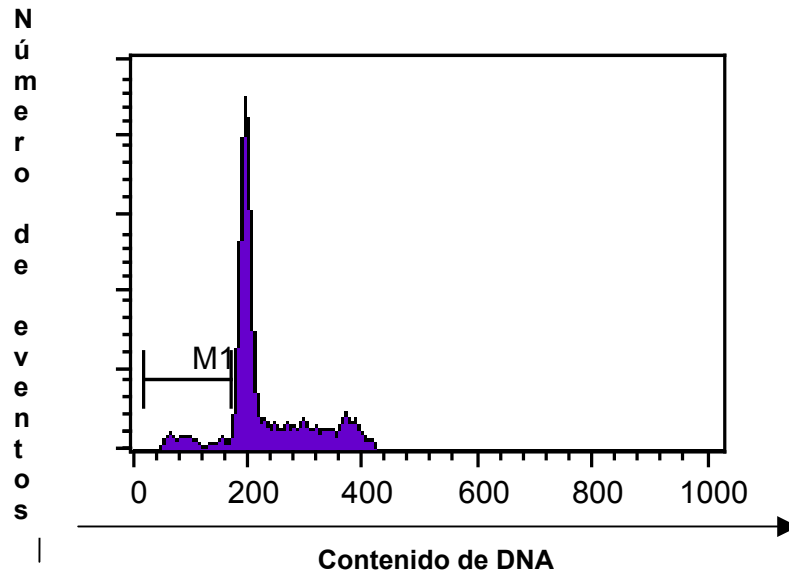
cantidad de DNA que tiene cada célula. La figura 69 muestra la gráfica de amplitud de señal contra incorporación de PI y que representa el contenido de DNA; esta gráfica permite identificar la fase del ciclo celular en que se encuentran las células. A las células que se encuentran en *G0/G1* se les asigna el valor de 200 en ambas coordenadas del gráfico (amplitud de señal contra contenido de DNA). Las células que se encuentran en fase *S* se visualizan como una línea que se incrementa en el eje de las ordenadas y las que se encuentran en fase *G2/M* (que han duplicado su contenido de DNA) se observan en el mismo eje en la coordenada de 400. A partir de la figura 69, se selecciona una región que contenga a las células en las fases mencionadas (R1 en la gráfica) lo que elimina los eventos que dan señales de 600, 800 ó más y que corresponden a todas las combinaciones en las que pasan dos o más células juntas y que el equipo detecta como un solo evento.

Fig 69. Gráfica de identificación de fases del ciclo celular que muestra la amplitud de señal (FL2-W) contra el contenido de DNA (FL2-Area) en el citómetro de flujo.



A partir de esta gráfica se generan histogramas que indican el contenido de DNA en un número de células determinado. La figura 70 muestra un histograma en el que se observan las diferentes etapas del ciclo celular. El pico con el mayor número de eventos (ubicado en 200) corresponde a las células en estado *G0/G1*, seguidas a la derecha por células que están duplicando su DNA (fase *S*) y en 400 las células en estado *G2/M*. La zona correspondiente a la izquierda del pico *G0/G1* son células con una cantidad menor de DNA, por lo tanto, se toman como células en estado necrótico o apoptótico por lo que mediante esta técnica podemos hacer estudios tanto del ciclo celular como de inducción de apoptosis.

Fig 70. Histograma generado a partir de células de la línea linfocítica Raji teñidas con yoduro de propidio que muestra las fases del ciclo celular y el porcentaje de células en estado apoptótico (M1).



Además de estas aplicaciones, el citómetro de flujo cuenta con un sistema denominado "sorter" que le permite separar células en tres diferentes contenedores de acuerdo al fluorocromo con el que están marcadas, con esta aplicación se tiene la ventaja de obtener subpoblaciones puras para estudios específicos.

BIBLIOGRAFÍA.

1. Bohn B. Flow cytometry: a novel approach for the quantitative analysis of receptor ligand interactions on surfaces of living cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1980 Oct;20(1):1-15.
2. Fulwyler MJ. Flow cytometry and cell sorting. *Blood Cells.* 1980;6(2):173-84.
3. Laerum OD, Farsund T. Clinical application of flow cytometry: a review. *Cytometry.* 1981 Jul;2(1):1-13.
4. Loken MR, Stall AM. Flow cytometry as an analytical and preparative tool in immunology. *J Immunol Methods.* 1982;50(3):R85-112.
5. Sugarbaker EV, Thornthwaite JT, Temple WT, Ketcham AS. Flow cytometry: general principles and applications to selected studies in tumor biology. *Int Adv Surg Oncol.* 1979;2:125-53.

CONCLUSIONES.

La finalidad de este manual de prácticas de laboratorio consiste en que el alumno asimile los conocimientos sobre el funcionamiento del sistema inmunitario humano y una vez que lo entienda podrá saber el porque se aplican estas técnicas de inmunología.

El presente manual cuenta con once prácticas, las cuales siguen un orden de lo sencillo a lo complejo para facilitar su comprensión. Además de contar con un índice general, cuenta también con índices de cuadros y figuras, lista de abreviaturas utilizadas en el texto y un anexo de preparación de reactivos.

Por otra parte se conocen los fundamentos de cada técnica, tipos de testigo, valores normales, limitaciones de la técnica, tipos de lectura, así como también se podrá interpretar los resultados obtenidos, con el cual se podrá realizar un mejor diagnóstico al interpretar correctamente el resultado de dichas técnicas y podrá emitir una mejor valoración del estado inmune de un paciente.

Además es fundamental para su formación como Químico Farmacéutico Biólogo y es una especialidad en el área clínica, y una herramienta indispensable para que el QFB, sepa si un individuo mantiene o no un estado de homeostasis.

ANEXO DE PREPARACION DE REACTIVOS.

Agar Noble:

Agar noble al 1% disuelto en SSF.
 SSAF: solución salina amortiguadora de fosfatos.
 Fosfato de sodio monobásico 2.585 g.
 Fosfato de sodio dibásico 7.98 g.
 Cloruro sodio 4.25 g.
 Los tres compuestos en 1000 ml de H₂O cbp.
 Disolver 0.5 g de Agar noble en SSAF.

Anticuerpos Preparados:

Anticuerpo monoclonal (Ac de ratón que reconoce inmunoglobulina humana) diluido 1:500 en solución bloqueadora.
 Anticuerpo conjugado (Ac de cabra que reconoce inmunoglobulina de ratón) diluido 1:1000 en solución bloqueadora.

Buffer de Fosfatos pH = 6.6.

Fosfato de potasio dibásico 3.8 g.
 Fosfato de potasio monobásico 5.47 g.
 Agua destilada cbp 1000 ml.

Nitroazul de tetrazolio al 0.1% en SSF (NBT).

PBS: solución amortiguadora de fosfatos.

Cloruro de sodio 0.8 g.
 Fosfato de potasio monobásico 0.2 g.
 Fosfato de potasio dibásico
 Dodecahidratado 2.9 g.
 Cloruro de sodio 0.2 g.
 Disueltos en H₂O suficiente para 1 litro.

Persulfato de amonio al 10%.

Persulfato de amonio 10 mg.
 Agua bidestilada 100 µl.

Regulador de Bloqueo pH= 7.3.

Gelatina/disolver en 100 ml agua caliente
 2.5 g.
 EDTA tetrasódico* 2.08 g.
 Disódico* 1.816 g.
 PBS 10X 100 ml.
 Tween 20 1 ml.
 Agua bidestilada 600 ml.
 * uno de los dos.
 Ajustar el pH con HCl 6N y. aforar a 1000 ml.

Rojo de ponceau.

Rojo de ponceau S 2.0 g.
 Ácido tricloroacético 30 g.
 Ácido sulfosalicílico 30 g.
 Agua bidestilada 100 ml.

Safranina al 0.5% en agua destilada.

SDS al 10%

SDS 10 g.
 Agua bidestilada cbp 100 ml.

Solución decolorante I.

Metanol absoluto 0.500 ml.
 Ácido acético glacial 100 ml.
 Agua bidestilada cbp 1000 ml

Solución decolorante II.

Ácido acético glacial 70 ml.
 Agua bidestilada cbp 100 ml.

Solución de Monómeros (Acrilamida y bisacrilamida: 30:1).

Acrilamida 30 g.
 Bisacrilamida 0.8 g.
 Agua bidestilada cbp 100 ml.

Solución de trabajo de azul de Coomassie.

Solución madre de A C R250 62.5 ml.
 Metanol absoluto 250 ml.
 Ácido acético glacial 50 ml.
 Agua bidestilada 500 ml.

Solución de Turk:

Ácido acético glacial 1.0 ml.
 Azul de metileno 1% 1.0 ml.
 Agua destilada cbp 100. ml.

Solución madre de azul de Coomassie.

Azul de Coomassie R250 2.0 g.
 Agua bidestilada cbp 200 ml.

Solución reguladora de corrimiento.

Trizma base	3.02 g.
Glicina	14.4 g.
SDS al 10%	10 ml.
Agua bidestilada cbp	1000 ml.

Solución reguladora de lavado PBS-tween.

PBS 10x	100 μ l.
Tween 20	1.0 ml.
Agua bidestilada	1000 ml.

Solución reguladora de muestra.

Glicerol	2.0 ml.
SDS al 10%	4.0 ml.
TRIZ-HCl pH = 6.8	2.5 ml.
Agua bidestilada	1.5 ml.
Se le agregan unos cristales de azul de bromofenol.	

Solución reguladora de transferencia.

Trizma base	3.02 g.
Glicina	14.4 g.
Metanol	200 ml.
Agua bidestilada	1000 ml.

Solución reguladora para el Gel concentrador.**TRIZ-HCl con pH= 6.8**

Trizma base	3.0 g.
Ajustar el pH con HCl 6N.	
Agua bidestilada	40 ml.
Aforar a	50 ml.

Solución reguladora para el Gel separador.**TRIZ-HCl con pH= 8.8.**

Trizma base	18.15 g.
Agua bidestilada	90 ml.
Ajustar el pH con HCl 6N.	
Aforar a	100 ml.
Se almacenan a temperatura ambiental.	

Solución reguladora salina-fosfatos (PBS 10X).

Cloruro de sodio	80 g.
Fosfato de potasio monobásico	2.0 g.
Fosfato de sodio dibásico	
Dodehidratado	29 g.
Cloruro de sodio	2.0 g.
Agua destilada	900 ml.
Ajustar el pH con HCl 6N.	
Aforar a	1000 ml.

Sustrato para la enzima.

4-cloro- α naftol	10 mg.
Metanol absoluto	3.33 ml.
PBS 10X	16.67 ml.
H ₂ O ₂ al 30%	16.67 μ l.