

36
24



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
ZARAGOZA

UTILIDAD DE LA SANGRE DE PERRO
EN MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO
P R E S E N T A :

MARISELA RESENDIZ AGUILAR



MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1991



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

I N D I C E

I.	INTRODUCCION	1
	1.1 ORIGEN DEL PERRO	2
	1.2 TECNICAS INMUNOLOGICAS	5
	1.3 MEDIOS DE CULTIVO	16
II.	FUNDAMENTACION DEL TEMA	18
III.	PLANTEAMIENTO DEL TEMA	20
IV.	OBJETIVOS	21
V.	HIPOTESIS	21
VI.	MATERIAL Y METODO	22
VII.	RESULTADOS	44
VIII.	ANALISIS DE RESULTADOS	71
IX.	CONCLUSIONES	76
X.	BIBLIOGRAFIA	78

I. INTRODUCCION

El uso de animales de experimentación en proyectos de Docencia e Investigacion tiene gran importancia desde hace mucho tiempo, esto ha llevado por consiguiente a la selección de cepas de una gran variedad de animales, para su aplicacion en las distintas areas Cientificas.

Los animales utilizados, por mencionar algunos ejemplos, son ratones, caballos, monos, carneros, cuyos, etc; y las aplicaciones que pueden tener cada uno de ellos es muy variada, pudiendo ejemplificar entre estas, la administracion de nuevos medicamentos antes de que puedan ser usados para consumo humano, con el fin de conocer su toxicidad y efectos adversos, la utilización de su sistema inmunitario para la produccion de vacunas, y una aplicacion especifica es la del cerdo como magnifico modelo biologico por sus semejanzas fisiologicas con el hombre, entre otras.

Ya que el perro en algunas Instituciones tiene la aplicacion de un modelo para la practica de cirugias, se puede hacer tambien uso de este como un animal de experimentacion en la obtencion de sueros hiperinmunes, asi como en la dotacion de hemoderivados como son:

Sangre total	Factor VII
Suero	Factor V
Plasma	Hemoglobina
Gibbulos rojos	Hemina

Además de que la relación existente entre el perro y el hombre puede ser tanto benéfica como perjudicial, en la primera por ser útil como compañía, vigilancia, protección, etc; y en la siguiente por ser fuente de problemas de salud pública, como la transmisión de enfermedades parasitarias y de rabia.

1.1 ORIGEN DEL PERRO

El hombre en su incesante búsqueda a lo largo de la historia y de la evolución ha tratado de encontrar el origen de las razas caninas. Este tema resulta de interés general si se tiene presente el hecho de que existen en el mundo razas caninas con talla y estructura sumamente diferente.

Entre las teorías que tratan de establecer el origen del perro manejadas con mayor frecuencia se encuentran: la que sostiene que el perro es descendiente directo del lobo, la que supone que proviene de una hiena o de un chacal domesticado, y aquella que considera que el perro es descendiente de los perros salvajes.

Es posible que los primeros animales llamados perros, hayan sido un tipo de lobo, pero hasta la fecha no se ha logrado la comprobación total de esta teoría.

Los paleontólogos con el fin de determinar el origen de estos carnívoros han hecho estudios geológicos; basándose en los fósiles encontrados en muchas partes del mundo.

En ellos se ha percibido una estrecha afinidad con algunas de

las razas caninas que hoy existen, relacionandolas con los craneos, dientes, quijadas y partes de algunos huesos de animales que existieron sobre la tierra hace 50 mil años aproximadamente. Probablemente estas relaciones se refieren al llamado PERRO DE PEAT O CANIS FAMILIARIS PALUSTRIS, que fué el primero que mereció el titulo de perro, y al cual también se le encontró en tiempos de los romanos; asimismo, es considerado el perro primitivo de las antiguas viviendas de Suiza.

Entre los fósiles más antiguos encontrados en el Continente Europeo, merece mención el esqueleto de un animal que existió en el año 1750 A.C.

Para comprender mejor la evolución de la familia del perro, se tiene que retroceder a 60 millones de años de Historia geológica; al período EOCENO, cuando los mamíferos que existían sobre la tierra eran relativamente nuevos y ninguno de ellos eran grande, fué en aquel entonces cuando existió un pequeño animal mamífero carnívoro que los paleontólogos han llamado MIACIS.

El MIACIS vivió en Europa y Asía, era un animal arbóreo, de cuerpo largo y miembros relativamente cortos, de cola larga, aproximadamente del tamaño de un gato montés, tenía cinco dedos apoyados en el piso y garras retráctiles como la de los gatos. Del Miacis evolucionó otro animal que algunos autores señalan como el CYNODICTIS.

El CYNODICTIS apareció en el período OLIGOCENO, mantuvo el cuerpo largo, sus miembros cortos, eran de pelo áspero, cola larga, con cinco dedos y garras retráctiles, parecido a una

comadreja. Algunos de los fósiles de este animal fueron encontrados en Dakota del Norte y en Colorado.

CYNODICTIS dió origen al CYNODESMUS que apareció en el MIOCENO, era una extraña cruz entre canino y felino, modificándose su cráneo y sus miembros, así como su locomoción; este ya no apoyaba el quinto dedo sobre el piso, sino le apareció como dedo rudimentario.

Del CYNODESMUS evolucionaron dos animales más, el DAPHAENUS y el TOMARCTUS.

El TOMARCTUS, ya tenía una forma de perro y dá origen durante el PLEISTOCENO a la familia CANIDAE en general y al género CANIS: Perro doméstico, perro salvaje, coyote, lobo, y otros.

Los perros tal y como los conocemos ahora evolucionaron a partir del PLIOCENO como una rama del TOMARCTUS.

Esto es una explicación lógica y convincente para todas aquellas razas cuya estructura es parecida a los lobos, con orejas erectas y cráneo alargado.

A partir de este punto, las demás razas se han formado por las siguientes causas:

1. Mutaciones naturales.
2. Por los distintos factores ambientales, climatológicas y reproductivos.
3. Por la domesticación.
4. Y finalmente por la intervención del hombre para fijar los distintos rasgos físicos y psíquicos para satisfacer sus intereses, necesidades y caprichos. El selector de estas

características en primer lugar ha sido el ambiente y en segundo lugar el hombre. (1)

1.2 TECNICAS INMUNOLOGICAS

Se han ideado numerosos métodos para determinar la cantidad de anticuerpo en un antisuero. Estos pueden clasificarse en dos tipos, métodos "in vivo" e "in vitro". El primero requiere el uso de animales de experimentación, mientras que el último se basa en reacciones visibles que ocurren al combinarse el antígeno con el anticuerpo.

Los métodos "in vivo" para estimar el contenido de anticuerpo de un antisuero, miden la capacidad relativa de tal antisuero para proteger a los animales de experimentación, contra dosis letales estandarizadas, de toxinas o de bacterias virulentas; estas determinan la capacidad de neutralizar las manifestaciones locales del antígeno, tales como las reacciones cutáneas producidas por toxinas, o la sensibilización pasiva local o generalizada.

Existen numerosos métodos para medir la potencia del anticuerpo, estos no toman en cuenta el tipo de las reacciones inmunes y son:

1. Métodos por dilución: Son los métodos clásicos de comparación de los sueros inmunes, basándose en el punto final de la dilución más alta del suero en que puede observarse la reacción; como precipitación, aglutinación, lisis o fijación de complemento, al agregar una cantidad constante de antígeno la dilución del suero

que da este punto final se conoce como título.

Los métodos de dilución son muy usados en el diagnóstico, y proporcionan un medio rápido para obtener datos comparativos sobre la potencia de varios antisueros.

2. Métodos de las proporciones óptimas, estos procedimientos determinan la relación antígeno/suero en la que aparece floculación con mayor rapidez. Se basan en la suposición de que la velocidad de aquella es una medida de la combinación del antígeno con el anticuerpo y se producirá más rápidamente cuando las proporciones relativas sean más favorables.

3. Métodos químicos cuantitativos. Este grupo de métodos, cuyo uso se ha difundido, permite evaluar las cantidades del anticuerpo sobre una base ponderal cuya precisión, de acuerdo a los requisitos de la química analítica, ha contribuido a transformar la inmunoquímica en una ciencia exacta. (2)

1.2.1 HEMAGLUTINACION PASIVA

La aglutinación de un antígeno particulado por su anticuerpo específico es, clásicamente, el camino más simple de estimación de la cantidad de anticuerpo en suero.

Algunos antígenos solubles pueden cubrir materiales inertes tales como la bentonita o latex las cuales reaccionan como si ellas mismas fueran partículas con la especificidad antigénica del antígeno. Esto puede entonces ser usado para pruebas de aglutinación. Sin embargo, tales partículas son difíciles de

cubrir, preservar y estandarizar, y ellas no muestran el amplio rango de utilidad que fue al principio esperado de ellas.

Las células rojas sanguíneas, por otra parte se ha encontrado que son extremadamente convenientes como portadores pasivos de antígeno, ya que es posible cubrirlas con casi cualquier antígeno en su compleja superficie, están consideradas como los indicadores más sensibles.

Las células rojas de sangre tienen una superficie antigénica elaborada. Aunque esto puede facilitar el ataque de muchos antígenos ocasiona una complicación en la prueba debido a la frecuente presencia de anticuerpos heterófilos naturales a las células en el suero de muchos animales y estos anticuerpos pueden eliminarse antes de que la propia prueba sea llevada a cabo. La superficie del Antígeno tiene, sin embargo, la facilidad de ser usada para un firme ataque del antígeno a una célula por acoplamiento primero a un anticuerpo anti-célula roja. (3)

Con algunos antígenos, particularmente los polisacáridos, las células rojas pueden efectivamente ser cubiertas solamente exponiéndolas al antígeno por un corto tiempo. Con algunas proteínas este tipo de recubrimiento puede también tener lugar, pero la sensibilidad de las células resultantes es mejorada enormemente, si su aglutinabilidad es incrementada por previo curtido. (4)

Un recubrimiento más seguro de las células puede ser acompañado por ataque del antígeno a ellas a través de un enlace covalente.

Se pueden distinguir tres tipos de recubrimiento: absorción directa del antígeno por la células, la técnica de células curtidas, y un firme enlazamiento del antígeno a las células por varios medios, usualmente químicos. El reactivo producido en cada caso es sin embargo, el mismo y da resultados similares en la prueba de aglutinación.

Se tiene que hacer notar que es posible realizar pruebas al inverso de este tipo por recubrimiento de la células con anticuerpo y usándolas después de ello para probar la presencia de antígeno. (5, 6)

Para evitar las complicaciones producidas por la presencia en pruebas de suero de aglutininas directas contra células rojas heterólogas, parece lógico usar células de la misma especie siempre que sea posible. Sin embargo, muchos investigadores han usado células de carnero o de humano del grupo O, ambas son bastante fáciles de obtener en gran cantidad. Es usual absorber aglutininas no específicas contra estas células en una etapa de dilución inicial antes de la propia dilución. En muchos aspectos las células de carnero tienen resultados satisfactorios en la práctica, aunque las células humanas, se dice, tienen más sensibilidad para la técnica de curtido de células. (7)

Dificultades han sido experimentadas con células de conejo, ratón y pollo en algunos sistemas (8), aunque se encuentran adecuadas en otros (9, 10). Las células de cerdo se han encontrado ser muy apropiadas como portadores en un sistema completamente homólogo, y células de caballo, mono y cobayo han

sido también usadas con buen éxito. (8, 9, 10)

Muchos polisacáridos cubren células en una forma simple, así que estos son reactivo inmediatamente para anticuerpo.

Muchos métodos simples son usualmente satisfactorios para el proceso de cubrimiento, el antígeno es solamente incubado con células frescas o formalinizadas. Hay con frecuencia una relación directa entre la sensibilidad de las células resultantes al anticuerpo, la concentración del antígeno usado, y el tiempo de exposición de las células, pero la temperatura a la cual la reacción debe llevarse a cabo no parece ser crítica. (11)

1.2.2. COMPLEMENTO

El sistema del complemento es uno de los sistemas enzimáticos desencadenado en el plasma de sangre; su acción es usualmente iniciada por la combinación de anticuerpo y antígeno. Es muy complejo, este compuesto; por lo menos 60 proteínas. La reacción central del sistema del complemento puede ser considerado como el desdoblamiento de C_3 a C_{3a} , un fragmento anafilotóxico de 6800 mol/g, y C_{3b} , el fragmento más largo, el cual tiene un sitio de unión evanescente, por el cual llega a ligarse al sitio de fijación del complemento. C_3 es el componente voluminoso del sistema, y todas las reacciones del sistema pueden relacionarse convenientemente al desdoblamiento (activación), inactivación, y subsecuente parte en la causalidad de la lesión lítica y otros fenómenos biológicos (por ejemplo: adherencia y fagocitosis).

La vía clásica de la fijación del complemento es mediada por complejos antígeno-anticuerpo los cuales unen por la vía C a su componente C₁. El C₁ sufre una reacción de activación requiriendo iones calcio en el cual C_{1q} es convertido a una enzima activa por mecanismos desconocidos, desdoblándose a C_{1r} para producir la enzima activa C_{1r}. Esta tiene dos sustratos C₄ y C₂, C₄ es una molécula larga con tres cadenas la cual, se desdobla por C_{1r}, uniéndose a C₂ en la presencia de iones magnesio. C₂ está también sujeto a ataque por C_{1r}, conduciendo a la formación del complejo enzimático C₃, esta es la C₃-convertasa de la vía clásica.

El complejo C₃ ocupa el sitio de acción del complemento por un sitio de unión en C_{3b}, similar al C_{3b}. La enzima tiene una vida media corta, alrededor de 5 minutos a 37°C.

La vía alterna puede activarse por numerosos agentes, incluyendo anticuerpos y sus fragmentos F(ab)₂, endotoxinas, varios complejos polisacáridos y factor veneno de cobra. El rasgo distintivo, esencial de la vía es que se incorpora a un ciclo de retroalimentación positiva. El producto principal de la vía alterna es la convertasa C_{3b}, mismo constituyente esencial de la convertasa, se combina con el factor B en presencia de iones Mg⁺⁺ y el factor B, entonces se divide por factor D. Hay una terminación paralela en los mecanismos de reacción de C_{3b} y el factor con los de C_{4b} y C₂. Los mecanismos de iniciación de la vía alterna quedan algo en disputa. Sin embargo, lo siguiente parece ser acordado generalmente.

1. Cualquier reacción la cual fragmente C₃ a C_{3b} es capaz de

desencadenar el ciclo de retroalimentación.

2. Al menos otras 2 proteínas están involucradas en la vía alterna, la properdina es un factor de iniciación. Ambas tienen la propiedad de estabilizar \bar{C}_3 , B_b , y enzimas relacionadas cuando están en forma activada, la naturaleza de las reacciones que causan su activación no es entendido completamente.

3. El complejo C_3 , B es una convertasa activa débil de C_3 sin fragmentación del factor B por el factor D. El mismo factor D es posiblemente una proenzima, la cual requiere activación a \bar{D} .

Es evidente que el ciclo de retroalimentación, como se describió, sigue hasta que uno de los reactivos se agota. En realidad, hay un potente mecanismo homeostático mediado por el inactivador C_3b . Esta es una enzima la cual fragmenta a C_3b para inactivarlo, desencadenando el ciclo de retroalimentación y hacerlo más susceptible a otras enzimas proteolíticas. Hay un factor adicional - globulina IH - la cual es necesaria como un cofactor para la actividad del C_3b inactivador.

Hay también un inhibidor de \bar{C}_1 . Este actúa bastante diferente, es un inhibidor estequiométrico, el cual reacciona con la enzima activa, también se inhibe algo de las proteasas de los sistemas fibrinolítico y químico.

La fase terminal de la secuencia del complemento es la que es responsable por lo mejor conocido y más característico de sus actividades, aunque posiblemente uno de los menos importantes biológicamente, esto es de la formación del complejo multimolecular el cual penetra membranas biológicas y es

responsable de la hemólisis y muerte bacteriana directa. No hay actividad enzimática conocida involucrada una vez que C_5 se ha fragmentado en C_{5a} y C_{5b} . La primera es una anafilotoxina y que más tarde se combina con C_6 y C_7 para formar un complejo trimolecular el cual tiene difusión limitada para la activación del sitio por el cual ataca a la membrana biológica u otras estructuras cercanas haciéndose inactiva espontáneamente.

El complejo lítico es completado por la adición de C_8 y de varias moléculas de C_9 . Al parecer el mismo complejo se inserta en la membrana biológica formando un "embudo" a través del cual los iones pueden pasar libremente; el cual la célula no es capaz de reparar. La incompetencia osmótica lleva a la hinchazón y finalmente, a la ruptura de la célula. (12)

El complemento es uno de los principales mecanismos humorales efectores del daño de los tejidos, inducido por los complejos inmunitarios. Los ensayos clínicos útiles de complemento consisten primordialmente en el ensayo hemolítico total o de CH_{50} , y la fijación del complemento.

La hemólisis de los eritrocitos mediada por anticuerpos específicos en presencia de la secuencia intacta del complemento puede ser empleada como una prueba cruda escrutadora de la actividad del complemento en el suero humano. Sin embargo; su utilidad se ha limitado ya que es necesaria una reducción drástica en los componentes para producir una reducción en la prueba de hemólisis. De manera clásica, la prueba de hemólisis emplea eritrocitos de carnero (E), un anticuerpo de conejo (A) para los

eritrocitos de carnero y el suero fresco de cobayo como fuente de complemento (C). La hemólisis se mide espectrofotométricamente como la absorbancia de la hemoglobina liberada y puede relacionarse de manera directa con el número de eritrocitos lisados. La cantidad de lisis en un sistema estandarizado empleando E, A y C describe una curva sigmoide (en forma de S *italica*) cuando los valores son gráficos contra las cantidades crecientes de complemento añadido.

La curva tiene forma de S, pero en la región intermedia cerca de 50 % de hemólisis, existe una relación casi lineal entre el grado de hemólisis y la cantidad de complemento presente. En esta gama, el grado de eritrocitos lisados es muy sensible a cualquier alteración en la concentración del complemento. Para fines clínicos, la medición de la actividad hemolítica total del suero es tomada en el nivel del 50 % de hemólisis. CH⁵⁰ es una unidad arbitraria que se define como la cantidad de complemento necesario para la lisis de 50 % de los eritrocitos en condiciones estándar rígidas de sensibilización de los eritrocitos con anticuerpo (EA). Estos resultados son expresados como la recíproca de la dilución del suero que da 50 % de hemólisis. Muchas variantes de la prueba pueden influir sobre el grado de hemólisis. Estas incluyen la concentración de los eritrocitos, la fragilidad (edad) de los mismos, la cantidad de anticuerpo empleado para la sensibilización, la naturaleza del anticuerpo (por ejemplo, IgG o IgM), la fuerza iónica del sistema amortiguador, el pH, el tiempo de reacción, la temperatura y la concentración de los cationes

divalentes (Ca^{++} o Mg^{++}).

El valor de las unidades CH en el suero humano puede determinarse en varias formas. Habitualmente se emplea la ecuación de Von Krogh, la cual convierte la curva sigmoide de titulación del complemento en una línea casi recta.

La curva sigmoide descrita por la ecuación de Von Krogh:

$$X = K \left(\frac{Y}{1 - Y} \right)^{1/n}$$

donde:

X = ml de C diluido que son añadidos.

Y = Grado de porcentaje de lisis.

K = Cte.

n = 0.2 + 10% en condiciones estáticas de E y A.

Es conveniente convertir la ecuación de Von Krogh a una forma logarítmica, la cual vuelve a la curva lineal para poder graficar los resultados clínicos (13).

I.2.3. CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO

Uno de los avances más significativos en métodos inmunológicos en años recientes, ha sido el sistema de ensayo de células de Jerne y Nordin. Este método mide el número de células formadoras de anticuerpos contra antígenos de células rojas sanguíneas, permitiendo el estudio directo de la cinética celular.

La formación de placas es debido a la liberación de hemolisina por una sola célula productora de anticuerpos, reveladas con complemento después de incubar en una capa de agar, una mezcla de glóbulos rojos de carnero y células linfoides de conejo inmunizado con glóbulos rojos de carnero.

Experimentos de este tipo con células linfoides de conejo es semejante a usar células de bazo de ratón, mostrando que el número de placas obtenido por esta vía es proporcional al número de placas de células linfoides. Esto sugiere que cada placa es debido a la actividad de una célula individual. Microscópicamente una placa se muestra como una zona hemolítica circular en un campo de células rojas esparcidas estrechamente, el centro de la mayor parte de las placas linfoides es presumiblemente visto como la célula liberadora de anticuerpos sensibilizados. (14)

Muchas modificaciones (15, 16, 17, 18) permiten el uso de Bacterias, Haptenos, polipéptidos sintéticos (19), y más recientemente heterólogos de gamma globulinas como antígenos.

I.3. MEDIOS DE CULTIVO

Un medio de cultivo microbiológico satisfactorio debe contener fuentes disponibles de donadores y aceptores de hidrógeno, carbono, nitrógeno, azufre, fósforo, sales inorgánicas y en ciertos casos, vitaminas y otras sustancias promotoras de crecimiento. Esto originalmente fue provisto en la forma de infusiones de carne, las cuales en ciertos casos, son muy usadas en los medios de cultivo. La carne o extractos de levadura frecuentemente reemplazan las infusiones de carne, pero la preparación de estas sustancias están, sujetas a la pérdida de sus factores nutritivos lábiles al calor, más que de la misma manera como infusiones son afectadas, La adición de peptonas provee una fuente disponible de nitrógeno y carbono.

La peptona es usada en los medios de cultivo para proveer una fuente de nitrógeno, desde proteínas nativas que generalmente no son afectadas por las bacterias. Mas microorganismos son capaces de utilizar los aminoácidos y otros compuestos simples de nitrógeno presentes en la peptona. (20, 21)

El desarrollo de microorganismos sobre medios de cultivo depende de un número importante de factores como son :

- a. La disponibilidad de los nutrientes adecuados.
- b. La disponibilidad del oxígeno u otros gases según sean requeridos.
- c. La necesidad de un cierto grado de humedad.
- d. El medio debe ser parte de la reacción apropiada

- e. Las relaciones de temperatura apropiada.
- f. Las condiciones de esterilidad del medio.
- g. Evitar la contaminación.
- h. La adición de sustancias que enriquezcan el medio.
- i. La adición de colorantes para la selección, diferenciación e identificación de microorganismos. (22, 23, 24, 25, 26)

Ciertas bacterias requieren de la adición de otros nutrientes tales como suero o sangre a los medios de cultivo en los cuales van a ser propagados. Los carbohidratos pueden también ser necesarios a veces y ciertas sales como el calcio, magnesio, manganeso, sodio y potasio parecen ser requeridos.

El cultivo en sangre esta entre los procedimientos de máxima prioridad comprometidos por el laboratorio de Microbiología.

Este medio de cultivo representa una base rica en nutrientes, la cual provee condiciones de crecimiento óptimos para microorganismos exigentes. El valor de pH 6.8 estabiliza los corpúsculos de los glóbulos rojos, y favorece la formación de claras zonas de hemólisis.

La sangre de carnero fresca es la más adecuada para determinar las diferentes formas de hemblisis.

La razón de tal prioridad de este medio es obvia, por la gran necesidad de la Clínica para conocer rápida y exactamente la presencia de microorganismos patógenos.

II. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Con base en los requerimientos de abastecimiento de Hemoderivados, se propone una investigacion del perro como animal de experimentacion que es de facil accesibilidad, bajo costo y amplia aplicacion en la investigacion dentro de las Ciencias Biomedicas.

El perro pertenece a la familia de los Canidaeos, y su nombre generico es Canis familiaris.

Es un animal que existe en el mundo en diversas razas con talla y estructura sumamente diferente; tan pequenos como el Chihuahueho y tan grande como los Mastines, con pelo largo, pelo corto, pelo de alambre o sin el; orejas erectiles, caidas, redondas o en punta; con ojos saltones, redondos o almendrados, con diferentes formas de craneo, etc.

Tiene un promedio de vida de 15 años, la hembra llega a la pubertad a los 6 a 12 meses dependiendo de la raza, y el macho aproximadamente de 1 a 2 meses después. El periodo de gestacion varia entre los 58 y 63 dias, y tienen un promedio de crías de 2 a 4 en razas pequenas y hasta 15 en razas grandes. La vida reproductiva en las hembras es de 6 a 10 años y en los machos de 6 a 14 años.

El hombre a tenido una importante intervencion para fijar los distintos rasgos fisicos psiquicos para satisfacer sus intereses, necesidades y caprichos, acentuandoles sus facultades naturales por medio de la seleccion como: la vista, el olfato para rastrear, la rapidez para cazar, el temperamento para defender o la inclinacion a la fidelidad y el afecto del perro para con su amo.

Entre los usos del perro está el de protección, de guía (ciegos), así como el rastreo de personas perdidas y drogas.

Son animales nobles y su alimentación es económica, además que tienen un valor estimativo muy alto.

Teniendo en cuenta que en la Ciudad de México el número de perros callejeros es muy grande; y que son animales que después de mucho deambular y malos cuidados terminan en Instituciones Antirrabicas para su control y después su muerte, o bien son canalizados a algunas Instituciones donde se les emplea para estudios Anatomofisiológicos. se habla entonces de un animal que puede jugar dos papeles importantes en una Institución de Investigación, primero como guardián y segundo como un modelo biológico de experimentación . /

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El trabajo de Laboratorio de Inmunología y de Microbiología requiere del uso de sangre de carnero, ya que está es indispensable para la preparación de medios de cultivo o como un reactivo biológico más en algunas técnicas de laboratorio como Hemaglutinación pasiva, Inhibición de la Hemaglutinación, Titulación de Hemolisina, Titulación de Complemento, Fijación de Complemento, Células formadoras de anticuerpos, Producción de sueros hiperinmunes, Pruebas de neutralización, Preparación de medios de cultivo con suplemento de sangre total o Hemoderivados.

Todo esto origina una gran necesidad de la sangre con frecuencia, y el problema en esto radica en que a veces no se cuenta con el animal, esto es por su costo, mantenimiento, o simplemente por descuidos de este, así su pérdida da como consecuencia la carencia de reactivos en el laboratorio, o en algunos casos muy extremos tener que utilizar sangre humana.

Este proyecto está encaminado a la investigación de la sangre de perro, en la elaboración de Medios de cultivo y técnicas Inmunológicas, con el fin de verificar si está puede utilizarse para reemplazar a la sangre de carnero.

IV. OBJETIVOS

1. Determinar el aprovechamiento de la sangre de perro en diferentes medios de cultivo microbiológico.
2. Investigación de la capacidad del perro para la producción de anticuerpos.
3. Estimación de la especificidad y títulos de los anticuerpos producidos por el perro.
4. Utilidad de los hemoderivados del perro en técnicas comunes inmunológicas.

V. HIPOTESIS

Si la sangre de perro posee características similares a la sangre de carnero, que es útil en las áreas de Microbiología e Inmunología, entonces tendrá las mismas aplicaciones, tanto en el diagnóstico, como en la investigación del área Biomédica.

VI. MATERIAL Y METODO

VI.1) MATERIAL

A) MATERIAL BIOLÓGICO

Glóbulos rojos de Carnero

Glóbulos rojos de Humano

Glóbulos rojos de Perro

Glóbulos rojos de Rata

Sangre desfibrinada de Perro

Suero de Cobayo

Suero Humano descomplementado

Suero de Perro

Cepas Bacterianas (Tomadas del Cepario de E.N.E.P. ZARAGOZA)

Bacillus anthracisStreptococcus faecalisBacillus cereusStreptococcus mutansBacillus subtilisStreptococcus pyogenesCandida albicansStreptococcus sanguisCorynebacterium equi

Estreptococo hemolítico beta

Corynebacterium xerosisEscherichia coliListeria mesenteroidesPseudomona aeruginosaSalmonella typhiStaphylococcus aureus

B) REACTIVOS

Acido Citrico Monohidratado. J. T. Baker.

Agarosa. Sigma

Bicarbonato de Sodio. J. T. Baker.

Citrato de Sodio Dihidratado. Monterrey.

Cloruro de Calcio Monohidratado. J. T. Baker.

Cloruro de Magnesio Hexahidratado. J. T. Baker.

Cloruro de Potasio. Merck.

Cloruro de Sodio. Monterrey.

Fosfato de Potasio Monobásico. J. T. Baker.

Fosfato de Sodio Dibásico. J. T. Baker.

Gelatina. J. T. Baker.

Glucosa. Merck.

Medio Esencial Mínimo en Earle. Microlab.

Rojo de Fenol. Sigma.

Sulfato de Magnesio Heptahidratado. Merck.

Trietanolamina. J. T. Baker.

Base de Agar Sangre. Merck.

C) MATERIAL

Algodón

Bulbos de plástico para pipetas Pasteur

Cajas de Petri de 10 y 20 cm de diámetro. Corning y Pyrex.

Canúlas y Catéteres

Capilares

Equipo Quirúrgico

Espátula de Acero Inoxidable. Scientific Products.

Gradillas de 20 y 36 tubos

Jeringas desechables de 1, 3, 5 y 20 ml. Plastipak.

Matraces aforados de 100, 250, 500 y 1000 ml. Pyrex.

Matraces Erlen-Meyer de 50, 125, 250 y 1000ml. Pyrex.

Mechero Fisher. Scientific Products.

Microdilutores de 50 microlitros. Microtiter.

Micropipetas de 50 microlitros. Microtiter.

Papel Parafilm.

Pipetas graduadas de 1, 2, 5 y 10 ml. Pyrex.

Pipetas Pasteur.

Placas de Microtitulación de 12.7 x 9.5 cm. Cooke.

Portaobjetos de 75 x 25 mm. Profesional.

Probetas de 25, 50, 100 y 500 ml. Pyrex.

Tabla de disección de 40 x 25 cm.

Tamices metálicos de 3 a 4 cm de diámetro

Tela de Asbesto

Tubos de ensayo de 13 x 100 y 12 x 75 mm. Pyrex.

Tripie metálico

D) EQUIPO

Agitador Vortex-Genie

Balanza Analítica. Mettler, HBO

Balanza Granataria.

Baño de agua con temperatura controlada. Precision.

Centrifuga clínica de 8 camisas. Sol-Sat, V-2

Espectrofotómetro. Bausch & Lomb, Spectronic 20.

Incubadora. Riessa, EC.

Microscopio óptico. Carl-Zeiss.

Olla de presión de 10 l. Presto.

Potenciómetro. Sargent-Welch, PBL-400.

Refrigerador. Philips, 127-VCA.

VI. 2) P R E P A R A C I O N D E S O L U C I O N E S

1. SOLUCION DE ALSEVER.

Pesar:

20.5 g. Glucosa

8.0 g. Citrato de Sodio Dihidratado

0.55 g. Acido Citrico Monohidratado

4.2 g. Cloruro de Sodio

Disolver en un litro de agua destilada.

Esterilizar a 10 lbs. de presión por 15 min.

2. SOLUCION SALINA ISOTONICA: S.S.J.

Disolver 8.5 g. de Cloruro de Sodio en un litro de agua destilada.

3. SOLUCION DE HANKS.

Pesar:

1.0 g. Glucosa.

8.0 g. Cloruro de Sodio
0.4 g. Cloruro de Potasio
0.14 g. Cloruro de Calcio
0.1 g. Sulfato de Magnesio
0.06 g. Fosfato Monopotasico
0.06 g. Fosfato Disbdico
0.35 g. Bicarbonato de Sodio
0.02 g. Rojo de Fenol.

Disolver en un litro de agua.

Esterilizar a 10 lbs. de presión por 15 minutos.

4. SOLUCION SALINA-AMORTIGUADOR DE TRIETANOLAMINA, 10X pH=7.4
(TBS)

Pesar:

75 g Cloruro de Sodio
1.0 g. Cloruro de Magnesio
0.22 g. Cloruro de Calcio
28 ml. Trietanolamina.

Disolver 800 ml de agua destilada.

Se añade Acido Clorhidrico 1N suficiente para ajustar el pH a 7.4 y después se agrega agua destilada hasta completar el litro.

Para usar se diluye 1:10 con agua destilada y se añade gelatina a una concentracion final del 0.05 % (1X).

5. MEDIO ESENCIAL MINIMO (MEM).

Pesar 0.9486 g de MEM y disolver en 100 ml de agua destilada, esterilizar por filtración en membrana y agregar Bicarbonato de Sodio (10%) estéril, hasta el vire a color salmón.

6. AMORTIGUADORA DE FOSFATOS (PBS) 0.15 M, pH= 7.2.

Pesar:

8.0 g Cloruro de Sodio

0.2 g Cloruro de Potasio

1.15 g Fosfato de Sodio Dibásico

0.2 g Fosfato de Potasio Monobásico

Disolver en agua destilada y aforar a 1 litro.

VI. 3) MEDIOS DE CULTIVO

1) BASE DE AGAR SANGRE:

Suspender 40 g. en 1 litro de agua destilada, dejar reposar por 15 minutos y calentar a ebullición hasta disolver completamente, esterilizar en autoclave (15 minutos a 121 ° C). Después enfriar alrededor de 45 a 50 ° C, y agregar la sangre defibrinada estéril, en una concentración del 3 al 5 %. El medio es distribuido en cajas petri.

VI. 4) MATERIAL BIOLÓGICO

1. PREPARACION DE GLOBULOS ROJOS:

De los eritrocitos obtenidos de sangre en solución de Alsever, se toma una muestra en un tubo en condiciones de esterilidad, para lavarlos estos se centrifugan a 1500 rpm por 5 minutos, se elimina el sobrenadante, este paquete se resuspende en solución salina isotónica (S.S.I.) se centrifuga, se elimina el sobrenadante, repitiendo esta operación 3 veces, el paquete final se resuspende en el volumen de S.S.I para obtener la concentración final deseada.

2. SUERO DESCOMPLEMENTADO

El suero se pone en un baño de agua a 56 ° C por 30 minutos.

3. SANGRE DE PERRO

4. SUEROS HIPERINMUNES

VI.5) TÉCNICAS

I. PRECIPITACION EN CAPILAR.

1. Se toman 15 capilares y con un marcador, se dividen en cuatro partes iguales.

2. En 15 tubos de ensayo de 13 X 100 rotulados previamente, se hacen diluciones seriadas del Antisuero.

a. Se coloca 0.5 ml de solución salina en cada uno de los tubos de ensayo.

b. Al tubo 1 se agregan 0.5 ml del Antisuero, se mezcla bien con la pipeta.

c. Se toman 0.5 ml de tubo 1 y se pasan al tubo 2, se mezcla.

d. El procedimiento se repite para los tubos siguientes.

3. Se toma un tubo capilar y se absorbe por capilaridad un volumen tal de suero (Ag) que llegue hasta la primera de las marcas del tubo.

4. El tubo capilar se gira 180° C y se hacen descender el volumen de antisuero hasta el borde correspondiente.

5. Se absorbe en forma similar a la descrita en el punto 3, un volumen tal del Antisuero. Sin diluir, que llegue hasta la segunda marca del tubo.

b. Se mezcla por inversión repetida.

7. Con el dedo índice se tapa uno de los extremos del capilar y se deja que el contenido quede en las marcas intermedias.

8. El capilar se introduce en una gradilla de plastilina.

9. Se repite el procedimiento señalado desde el inciso 3 al 8 para cada una de las diluciones del Antisuero.

10. Se dejan unos minutos a temperatura ambiente y se guardan en refrigeración por 24 a 48 hrs.

11. Se mide la cantidad de precipitado en milímetros.

12. Graficar la cantidad de Antisuero agregado contra la cantidad de precipitado.

II. HEMAGLUTINACION EN PLACA.

1. Tomar una muestra de Antisuero y descomplementar.

2. Preparar una suspensión de glóbulos rojos, (ver: MATERIAL BIOLÓGICO), al 1 % en solución salina isotónica (S.S.I).

3. En una placa de Microtitulación poner 50 ul de solución de PBS en 12 pozos, para realizar diluciones al doble del Antisuero.

4. Con un microdilutor de 50 ul, previamente quemado a la flama, tomar una muestra del Antisuero.

5. Poner esta muestra en el primer pozo, y agitar girando para homogenizar.

6. Pasar una muestra con el microdilutor al segundo pozo, agitar.

7. El procedimiento se repite para los 9 pozos siguientes.

8. Agregar 50 ul de la suspensión de glóbulos rojos al 1 %, a los 12 pozos.

9. Cubrir las placas con papel parafilm, e incubar a 37^o C por una hora.

10. Guardar en refrigeración por 24 horas.

11. Observar el primer pozo en el cual se produce la aglutinación y tomar como título el pozo anterior a este.

III. HEMAGLUTINACION EN TUBO.

1. Descomplementar una muestra de Antisuero.

2. Preparar una suspensión de glóbulos rojos al 1 % en S.S.I.

3. En una serie de 14 tubos agregar 0.5 ml de PBS, a cada uno.

4. Tomar una muestra de 0.5 ml del Antisuero y llevarla al primer tubo, mezclar, con la pipeta.

5. De este tubo tomar 0.5 ml y llevarlos al segundo tubo, mezclar.

6. Repetir el procedimiento, hasta el tubo 13, el último es el testigo.

7. Agregar 0.5 ml de suspensión de glóbulos rojos al 1 % a los 14 tubos.

8. Incubar los tubos a 37^o C por una hora.

9. Guardar en refrigeración por 24 horas.

10. Observar el primer tubo de la serie el cual se forma la aglutinación de eritrocitos y tomar como título el tubo anterior a este.

IV. DETERMINACION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO POR EL METODO DE JERNE

1. Se toman ratones inmunizados previamente 6 días antes y se sacrifican en cámara de éter.

2. Se extrae el bazo, y se pasa a una caja de Petri, que contenga 4 ml de solución de Hanks, el bazo se coloca en un tamiz metálico y con un tubo se macera, quedando en el tamiz sólo la cápsula del bazo.

3. La suspensión se pasa a un tubo de ensaye y se deja sedimentar 3 minutos, el sobrenadante se pasa a tubos limpios y se hacen diluciones 1:10 y 1:20 con solución de Hanks, se debe realizar en baño de hielo.

4. Se lavan los glóbulos rojos en solución salina 3 veces y se diluyen 1:10 en solución de Hanks.

5. Se prepara agarosa al 0.6 % en medio esencial mínimo (MEM), y mantener en un baño a 45^o C.

6. En un tubo de ensaye se mezclan 0.1 ml de las suspensión de células más 2 ml de la suspensión de glóbulos rojos, más 2 ml de agarosa, se homogeniza la suspensión usando un agitador Vortex.

7. La suspensión se vacía rápidamente a una caja de Petri de 10 cm de diámetro y se distribuye la agarosa por toda la caja con movimientos circulares.

8. Se deja reposar la caja en una superficie lisa hasta que solidifique la agarosa, se incuba a 37° C durante 45 minutos.

9. Se agrega a cada caja 2 ml de complemento fresco de cobayo diluido 1:10 en solución de Hanks.

10. Se distribuye en toda la placa y se incuba a 37° C por 30 minutos.

11. Se deja en refrigeración por 24 horas, para hacer más nítidas las placas líticas.

12. Cuantificar el número de placas hemolíticas por caja.

V. TITULACION DE HEMOLISINA EN UNIDADES 50 % HEMOLITICAS

1. Preparar una suspensión de glóbulos rojos, lavando previamente con solución salina isotónica, y poner al 2 % en TBS 1X.

2. Ajustar la suspensión en el espectrofotómetro, de la

siguiente manera: Mezclar 0.6 ml de la suspensión de eritrocitos al 2 % y 3.4 ml de agua destilada. Leer la densidad óptica (D.O.) a 550 nm, utilizando un blanco de agua destilada. el 100 % de hemólisis debe dar una D.O. de 0.5, si no se obtiene esta lectura se corrige el volumen mediante la siguiente ecuación.

$$V2 = \frac{D.O. \times V1}{0.5}$$

3. Descomplementar una muestra de Hemolisina.

4. Preparar 3 diluciones de la Hemolisina en TBS:

A. 0.1 ml Hemolisina + 9.9 ml TBS (1:100)

B. 2.0 ml A + 8.0 ml TBS (1:500)

C. 1.0 ml A + 9.0 ml TBS (1:1000)

5. Se colocan 14 tubos, usando 4 para cada dilución de la Hemolisina y 2 para los testigos de la prueba.

TUBO	DILUCION	G. R. 2%	TBS	AGUA DESTILADA
1	1.0 ml	0.6 ml	0.4 ml	-
2	0.7 ml	0.6 ml	0.7 ml	-
3	0.5 ml	0.6 ml	0.9 ml	-
4	0.3 ml	0.6 ml	1.1 ml	-
Testigo +	-	0.6 ml	-	3.4 ml
Testigo -	-	0.6 ml	2.4 ml	-

6. Se mezclan los 14 tubos y se incuban en un baño de agua a

37^o C durante 30 minutos, con agitación frecuente.

7. Obtener suero fresco de cobayo y diluir 1:50 en TBS, para obtener 2 unidades 50 % hemolíticas de Complemento.

8. Sacar los tubos y adicionarle a cada uno un ml de complemento, e incubar de nuevo a 37^o C por 30 minutos, con agitación frecuente.

9. Sacar los tubos del baño y agregarle a todos un ml de TBS frío, excepto el testigo positivo, agitar los tubos.

10. Centrifugar los tubos a 1500 rpm por 5 minutos.

11. Leer los sobrenadantes a 550 nm usando como blanco el tubo testigo negativo.

12. Calcular para cada tubo el porcentaje de hemólisis en relación con el testigo positivo y el volumen necesario de Hemolisina para producir 50 % de hemólisis, graficando un papel semilogaritmico de Probitas, en las abscisas el porcentaje de hemólisis y en las ordenadas el volumen de suero usado.

VI. DETERMINACION CUANTITATIVA DEL COMPLEMENTO HUMANO EN UNIDADES 50% HEMOLITICAS

1. Preparar una suspensión de glóbulos rojos, lavando 3 veces en SSI y poner al 2 % en TBS 1X.

2. Ajustar la suspensión en el espectrofotómetro, de la

siguiente manera, mezclar 0.6 ml de la suspensión de eritrocitos al 2 % y 3.4 ml de agua destilada. Leer la D.O. a 550 nm, utilizando un blanco de agua destilada. El 100 % de hemólisis debe dar una D.O de 0.5, si no se obtiene esta lectura se corrige el volumen mediante la siguiente ecuación:

$$V2 = \frac{D.O. \times V1}{0.5}$$

3. A 10 ml de esta suspensión anterior se le adiciona un volumen igual de hemolisina previamente titulada y descomplementada (2 U 50% H) en TBS. Mezclar bien e incubar a 37°C durante 30 minutos con agitación frecuente. Transcurrido este tiempo se saca el matraz del baño y de esta manera se tienen los eritrocitos sensibilizados a una suspensión del 1 %.

4. Hacer tres diluciones del suero humano problema en TBS de la siguiente manera:

- A. 0.4 ml de suero + 9.6 ml TBS (1:25)
- B. 5.0 ml de A + 5.0 ml TBS (1:50)
- C. 5.0 ml de B + 5.0 ml TBS (1:100)

5. Colocar 14 tubos, usando 4 tubos para cada dilución del suero, y dos para los testigos de la prueba.

TUBO	DILUCIÓN SUERO (ml)	ERITROCITOS SENSIBILIZADOS (ml)	TBS (ml)
1	1.0	1.2	0.8
2	0.7	1.2	1.1

3	0.5	1.2	1.3
4	0.3	1.2	1.5
TESTIGO POSITIVO	-	1.2	-
TESTIGO NEGATIVO	-	1.2	1.8

Mezclar los 14 tubos e incubar a 37^o C durante 30 minutos con agitacion frecuente.

6. Sacar los tubos y adicionarles a todos 1 ml de TBS frio, excepto al testigo positivo, al cual se le pone 2.8 ml de agua destilada. Agitar los tubos.

7. Centrifugar los tubos a 1500 rpm por 5 minutos.

8. Leer los sobrenadantes a 550 nm usando como blanco el tubo como testigo negativo.

9. Calcular para cada tubo el porcentaje de hemolisis en relacion con el testigo positivo y graficar en papel semilogaritmico de probitas, trazado en las abscisas el porcentaje de hemblisis y en las ordenadas el volumen de suero usado en ml.

10. Localizar el volumen necesario para producir el 50 % de hemblisis, y calcular las unidades 50 % hembliticas por ml.

VI. METODOI. SANGRIA DE PERROS.

Primero se anestesió al perro y en condiciones asépticas se realizó venodisección en el cuello, utilizando equipo quirúrgico, se canalizó la vena descubierta con el uso de catéteres o de jeringas estériles, se sangró, la sangre se tomó en condiciones de esterilidad, usando mechero de alcohol, se recibió en matraces previamente estériles, conteniendo trozos de vidrio, para desfibrinar o solución de Alsever para mantener viables los eritrocitos, en cualquiera de los casos la sangre se mantuvo en refrigeración hasta su uso.

II. CULTIVOS.1. DEMOSTRACION DE LA EFICACIA DE AGAR SANGRE DE PERRO EN MICROBIOLOGIA.

Se prepararon cajas con Agar Sangre de Perro y Agar Sangre de Carnero a una concentración del 3 %.

A. PRUEBAS CON CEPAS BACTERIANAS.

Se sembraron cepas bacterianas del cepario de la E.N.E.P. "ZARAGOZA", simultáneamente en Agar Sangre de Perro (ASP) y Agar Sangre de Carnero (ASC) por estria cruzada, las cepas mencionadas en material biológico.

B. Se efectuó morfología Macroscópica y Microscópica de cada una de las cepas bacteriana para la comprobación de la eficiencia del medio.

C. Se utilizaron placas de ASP y ASC simultáneamente en las siguientes muestras clínicas.

26 Exudados faríngeos.

2 Exudados óticos.

8 Urocultivos.

5 Exudados vaginales.

2 Exudados nasales.

III. INMUNOLOGIA.

III.1. INMUNIZACIONES.

Se efectuarán inmunizaciones de cuatro perros con:

- a) Glóbulos rojos de Rata.
- b) Glóbulos rojos de Carnero.
- c) Glóbulos rojos de Humano.
- d) Suero humano total descomplementado.

III.2. Se inmunizaron dos conejos:

- e) Glóbulos rojos de Perro.

Los animales que fueron inmunizados con Glóbulos rojos siguieron el siguiente esquema de Inmunización.

40

INYECCION No.	TIEMPO DIA	DOSES (ml)	VIA
1	0	1.0	I
2	2	1.0	N
3	4	1.0	T
4	6	1.0	R
5	8	1.0	A
6	10	2.0	V
7	12	2.0	E
8	14	2.0	N
9	16	2.0	O
PRUEBA	21 ó 22		S
SANGRADO			A

El perro inmunizado con suero humano total (SHT) siguió el siguiente esquema:

INYECCION No.	TIEMPO DIA	DOSES (ml)	VIA
1	0	0.5	
2	3	1.0	I
3	6	1.5	V
4	9	2.0	
PRUEBA SANGRADO	14		

2. SANGRADO DE ANIMALES.

Para el sangrado de los perros fueron anestesiados y en condiciones asepticas se les realizo una venodisección en el cuello, la muestra de obtuvo usando una cánula, la sangre fue recibida en Matraz Erlenmeyer de 1 litro, y los animales se sangraron a blanco.

Los conejos también fueron sangrados a blanco, tomando la sangre por punción cardiaca.

La sangre se metio a la incubadora a 37 °C por una hora y se sacó para meter a refrigeración toda la noche para facilitar la contracción del cuáguo. El sobrenadante o suero se centrifugo a 2500 rpm durante cinco minutos, para eliminar totalmente los eritrocitos.

Los antisueros obtenidos se conservaron en congelación.

3. REACCIONES DE PRECIPITACION.

Con el antisuero obtenido del perro inmunizado con suero humano total, se realizo la prueba de precipitación en capilar, para cuantificar el titulo antes de la sangría y posteriormente para construir una curva de precipitación, para determinar el titulo que existia en los precipitados, para lo cual se hizo reaccionar un cantidad constante del antígeno, suero humano total, con diluciones al doble del Antisuero.

4. REACCIONES DE HEMAGLUTINACION.

El suero de los perros que fueron inmunizados con glóbulos rojos (carnero, rata y humano), así como el suero de los conejos inmunizados con glóbulos rojos de perro se titularon con la prueba de Hemaglutinación, primero se hizo para conocer el título de anticuerpos, antes de la sangría y después de esta, para obtener el título real del Antisuero.

Los Antisueros contra glóbulos rojos de carnero, humanos, y perro se titularon por Hemaglutinación en placa y el antisuero contra glóbulos rojos de Rata se tituló por Hemaglutinación en tubo.

5. DETERMINACION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO POR EL METODO DE JERNE

Para determinar funcionalmente las células formadoras de anticuerpos "in vitro", se utilizaron dos grupos de 5 ratones, uno de los cuales se inmunizó con glóbulos rojos de Perro (GRP) y el otro con glóbulos rojos de Carnero (GRC), previamente lavados y puestos a una concentración del 10 %, se inyectaron por vía intraperitoneal, 0.5 ml (40 U) de la suspensión correspondiente.

Las células obtenidas de los ratones inmunizados con los GRP, en el sistema final, al poner sobre el agar se le agregó una suspensión de GRP y de manera similar se hizo para células de los ratones inmunizados con GRC.

6. TITULACION DE HEMOLISINA, EN UNIDADES 50 % HEMOLITICAS.

Para determinar el titulo de la Hemolisina en unidades 50 % hemoliticas por ml, se usaron GRP y como fuente de Complemento Suero fresco de Cobayo, las lecturas sirvieron para calcular las unidades 50% hemoliticas por ml de hemolisina, y con esto se calculó el volumen en el cual se encuentran 2 U 50 % hemoliticas.

7. DETERMINACION CUANTITATIVA DEL COMPLEMENTO HUMANO EN UNIDADES 50 % HEMOLITICAS.

Para esta determinación se usaron 6 sueros humanos frescos de personas sanas, y la hemolisina utilizada fue la obtenida contra los glbbulos rojos de perro, la fuente de complemento fueron los sueros humanos y los eritrocitos usados fueron GRP.

VII. RESULTADOS

T A B L A 1

SIEMBRA EN AGAR SANGRE DE PERRO Y AGAR SANGRE DE CARNERO

CEPA	MORFOLOGIA COLONIAL	M. MICROSCOPICA	HEMOLISIS	
			ASC	ASP
<u>S. aureus</u>	Colonias redondas, 0.5 a 1 mm, convexa, lisa, entera, blanca grisacea, brillante opaca.	Agregados de cocos gram +	---	---
Estreptococos				
<u>S. pyogenes</u>	Colonias redondas, puntiformes, aprox. 0.5 mm, convexa, blanca grisacea, brillante, opaca.	Cocos gram +, agrupados en pares y cadenas	Beta +++	Beta ++++
<u>S. mutans</u>			Alfa +++	Alfa ++++
<u>S. faecalis</u>			Alfa +++	Alfa ++++
<u>S. sanguis</u>			Alfa +++	Alfa ++++
Estreptococo hemolítico			Beta +++	Beta ++++
<u>L. mesenteroides</u>	Colonias redondas, convexas de 1 a 2 mm, enteras, brillantes, opacas, cremosas	Cocobacilos agrupados en pares, gram -.	---	---
<u>Bacillus subtilis</u>	Colonias planas irregulares de 2 a 4 mm, blancas, sin brillo, consistencia seca.	Bacilos gram +	---	---
<u>B. cereus</u>			Beta +++	Beta ++++

<u>B. subtilis</u>	esmerilado.	---	---
<u>Escherichia coli</u>	Colonias redondas convexas, blancas grisáceas, enteras, opacas, brillantes, cremosas.	Cocobacilos gram -	---
<u>Salmonella typhi</u>	Colonias redondas convexas blancas grisáceas, de 1 mm, opacas, brillantes, cremosas	Bacilos gram -	---
<u>Pseudomona aeruginosa</u>	Colonias redondas, convexas blancas, translúcidas, brillantes, cremosas.	Bacilos gram -	---
<u>Candida albicans</u>	Colonias redondas, convexas blancas, brillantes, opacas, cremosas.	Bacilos gram -	---

T A B L A 1 ASIEMBRA EN AGAR SANGRE DE PERRO Y AGAR SANGRE DE CARNERO CON TELURITO
DE POTASIO 2%

CEPA

OBSERVACIONES

Corynebacterium xerosis

Se presentó la impregnación del te-

Corynebacterium equi

lurito en ambos medios; observandose

el ennegrecimiento característico
del medio.

T A B L A 2

SIEMBRA EN AGAR SANGRE DE CARNERO Y AGAR SANGRE DE PERRO DE MUESTRAS CLINICAS

No. MUESTRAS	USO CLINICO	MICROORGANISMO AISLADO	MORFOLOGIA
26	Exudados Faringeos	7 muestras con <u>Staphylococcus aureus</u>	Colonias de 1 a 3 mm, redondas, lisas, convexas, brillantes.
		1 muestra con Streptococo beta hemolitico.	Colonias puntiformes, redondas, mucoides, brillantes, blancas grisaceas, beta hemolitico.
2	Exudados dticos	1 muestra con <u>Pseudomona aeruginosa</u>	Colonias redondas, blancas, lisas, redondas, mucoides.
8	Urocultivos	1 muestra con <u>Escherichia coli</u>	Colonias redondas, de 2 a 3 mm, lisas, convexas,

enteras, brillan-
tes, mucoides.

5 Exudados

Vaginales

2 Exudados

Nasales

NOTA: La Morfología Colonial fue igual tanto en ASP y ASC.

T A B L A 3
ESQUEMAS DE INMUNIZACION CON GLOBULOS ROJOS (RATA, CARNERO,
HUMANO. Y PERRO) EN PERROS Y CONEJOS.

INYECCION NUMERO	TIEMPO DIA	DOSIS ml	VIA
1	0	1.0	I
2	2	1.0	N
3	4	1.0	T
4	6	1.0	R
5	8	1.0	A
6	10	2.0	V
7	12	2.0	E
8	14	2.0	N
9	16	2.0	D
10	22	2.0	S
11	26	2.0	A
SANGRADO	29		

T A B L A 3 A

ESQUEMA DE INMUNIZACION CON SUERO HUMANO TOTAL EN PERROS

INYECCION NUMERO	TIEMPO VIA	DOSES ml	VIA
1	0	0.5	
2	3	1.0	I
3	6	1.5	V
4	9	2.0	
SANGRADO	14		

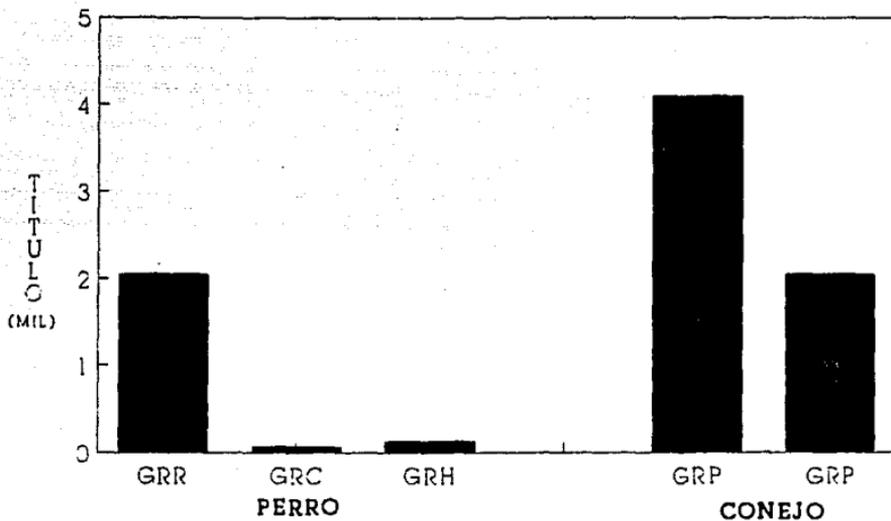
T A B L A 4

TITULO FINAL DE LOS ANTISUEROS (PRUEBA DE HEMAGLUTINACION)

PERRO INMUNIZADO	TITULO
1. Glóbulos rojos de rata	1:2048
2. Glóbulos rojos carnero	1:64
3. Glóbulos rojos humanos	1:128
CONEJOS	
1. Glóbulos rojos de perro	1:4096
2. Glóbulos rojos de perro	1:2048

Ver gráfica No. 1

TITULO ANTISUEROS



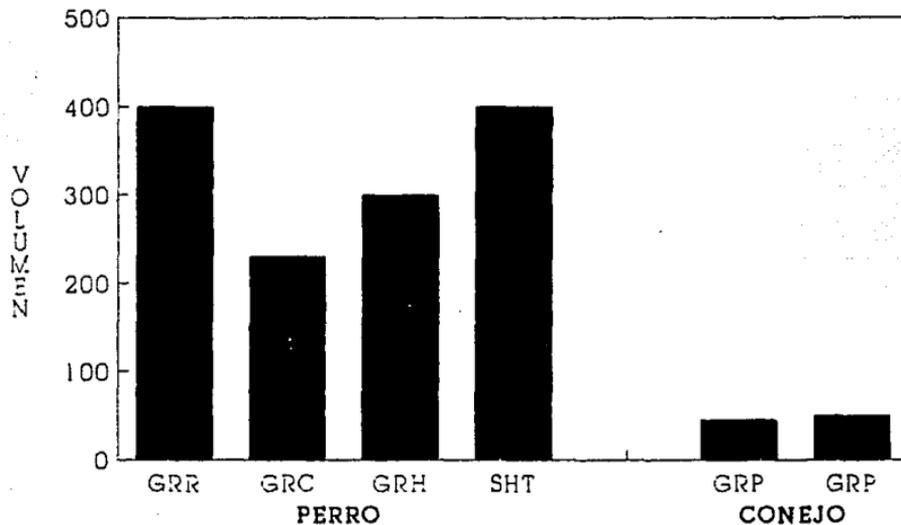
GRAFICA No. 1

T A B L A 5
VOLUMENES OBTENIDOS DE ANTISUERO

PERRO INMUNIZADO	VOLUMEN ANTISUERO (Mililitros)
1. Glóbulos rojos de rata	400
2. Glóbulos rojos carnero	230
3. Glóbulos rojos humanos	300
4. Suero Humano Total	400
CONEJOS	
1. Glóbulos rojos de perro	45
2. Glóbulos rojos de perro	50

Ver gráfica No. 2

VOLUMENES ANTISUERO



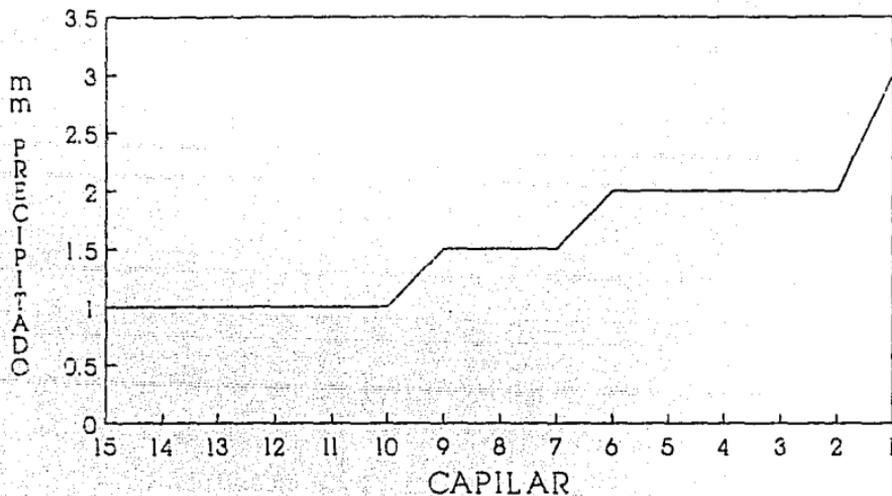
GRAFICA No. 2

T A B L A 6
REACCION DE PRECIPITACION DEL ANTISUERO HUMANO TOTAL

CAPILAR	mm DE PRECIPITADO	DILUCION ANTISUERO
1	3	1:2
2	2	1:4
3	2	1:8
4	2	1:16
5	2	1:32
6	2	1:64
7	1.5	1:128
8	1.5	1:256
9	1.5	1:512
10	1	1:1024
11	1	1:2048
12	1	1:4086
13	1	1:8172
14	1	1:16344
15	1	1:32688

Ver gráfica No. 3.

REACCION PRECIPITACION



GRAFICA No 3

T A B L A 7

CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO POR EL METODO DE JERNE

GLOBULOS ROJOS DE PERRO

DILUCION 1:10

CAJA	No. PLACAS LITICAS POR CAJA	FACTOR	CELULAS FORMADORAS TOTALES
1	174	400	69600
2	308	400	123200
3	325	400	130000
4	270	400	108000
5	244	400	97000

DILUCION 1:20

CAJA	No. PLACAS LITICAS	FACTOR	CELULAS FORMADORAS TOTALES
1	---	800	---
2	---	800	---
3	---	800	---
4	---	800	---
5	221	800	176800

T A B L A 7 A

CELULAS FORMADORAS DE ANTICUERPO POR EL METODO DE JERNE

GLOBULOS ROJOS DE CARNERO

DILUCION 1:10

CAJA	Nº. PLACAS LITICAS POR CAJA	FACTOR	CELULAS FORMADORAS TOTALES
1	275	400	110000
2	537	400	214000
3	274	400	109600
4	336	400	134400
5	260	400	104000

DILUCION 1:20

CAJA	Nº. PLACAS LITICAS	FACTOR	CELULAS FORMADORAS TOTALES
1	369	800	269200
2	282	800	225600
3	400	800	320000
4	224	800	179200
5	188	800	150400

T A B L A 8
TITULACION DE LA HEMOLISIS

SUERD 1

TESTIGO (+): 0.5

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:100	1:500	1:1000		1:100	1:500	1:1000
1	0.48	0.45	0.38	1.0	96	90	76
2	0.49	0.43	0.30	0.7	98	86	60
3	0.46	0.31	0.24	0.5	92	62	48
4	0.46	0.27	0.09	0.3	92	54	20

SUERD 2

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:100	1:500	1:1000		1:100	1:500	1:1000
1	0.48	0.48	0.40	1.0	96	96	80
2	0.46	0.42	0.39	0.7	92	84	78
3	0.45	0.34	0.24	0.5	90	68	48
4	0.45	0.21	0.17	0.3	90	42	34

 Ver gráfica No. 4

SUERD 1: Volumen en la gráfica necesario para causar el 50% de hemólisis 0.58 ml, equivalente a una unidad CH .

Por ml de suero se tienen 1.72 UCH / ml.

50

Pero es una dilucion 1:1000 por lo que en realidad se tienen 1.724

UCH / ml de suero.

50

Suero 2: Volumen en la grafica 0.45 ml, equivalentes a una UCH

50

Por ml de suero se tienen 2.22 UCH / ml.

50

Por la dilucion 1:1000 : 2222 UCH .

50

T A B L A 9

TITULACION DE CH50 (SUERO HUMANO DE PACIENTES SANOS)

Hemolisina 1 = 0.6 ml de suero = 2.06 UCH /ml.

50

Hemolisina 2 = 0.6 ml de suero = 2.66 UCH /ml:

50

HEMOLISINA 1

A)

TESTIGO (+)=0.46

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.42	0.27	0.12	1.0	91	59	26
2	0.38	0.19	0.08	0.7	82	41	17
3	0.27	0.13	0.05	0.5	59	28	10
4	0.16	0.05	0	0.3	35	10	0

B)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.45	0.44	0.27	1.0	98	95	59
2	0.44	0.39	0.18	0.7	95	85	39
3	0.43	0.26	0.09	0.5	93	56	19
4	0.35	0.12	0.03	0.3	76	26	6

C)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.46	0.40	0.14	1.0	100	89	30
2	0.45	0.30	0.10	0.7	98	65	22
3	0.41	0.19	0.05	0.5	89	41	11
4	0.24	0.08	0.02	0.3	52	17	4

D)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.46	0.38	0.21	1.0	96	79	44
2	0.41	0.28	0.14	0.7	85	58	29
3	0.38	0.22	0.10	0.5	79	46	21
4	0.26	0.12	0.05	0.3	54	25	10

E)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		%	1:25	1:50
1	0.48	0.46	0.40	1.0	100	96	83
2	0.46	0.45	0.30	0.7	96	94	62
3	0.46	0.42	0.18	0.5	96	87	37
4	0.42	0.24	0.06	0.3	87	50	12

F)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		%	1:25	1:50
1	0.46	0.45	0.35	1.0	96	94	73
2	0.47	0.43	0.23	0.7	98	89	48
3	0.45	0.35	0.13	0.5	94	73	27
4	0.40	0.24	0.05	0.3	83	50	10

Ver gráfica No. 5, 6.

HEMOLISINA 2

A)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		%	1:25	1:50
1	0.45	0.35	0.21	1.0	96	74	44
2	0.41	0.26	0.13	0.7	87	55	27
3	0.33	0.18	0.07	0.5	70	38	14
4	0.24	0.08	0.03	0.3	51	17	6

B)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.46	0.45	0.34	1.0	98	96	72
2	0.46	0.40	0.23	0.7	98	85	49
3	0.45	0.34	0.15	0.5	96	72	32
4	0.37	0.18	0.05	0.3	79	38	10

C)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0	0.44	0.29	1.0	0	93	67
2	0	0.35	0.20	0.7	0	74	42
3	0	0.28	0.11	0.5	0	59	23
4	0	0.16	0.05	0.3	0	34	10

D)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.46	0.40	0.25	1.0	96	83	52
2	0.44	0.32	0.18	0.7	92	67	37
3	0.40	0.25	0.11	0.5	83	52	23
4	0.30	0.15	0.04	0.3	62	31	8

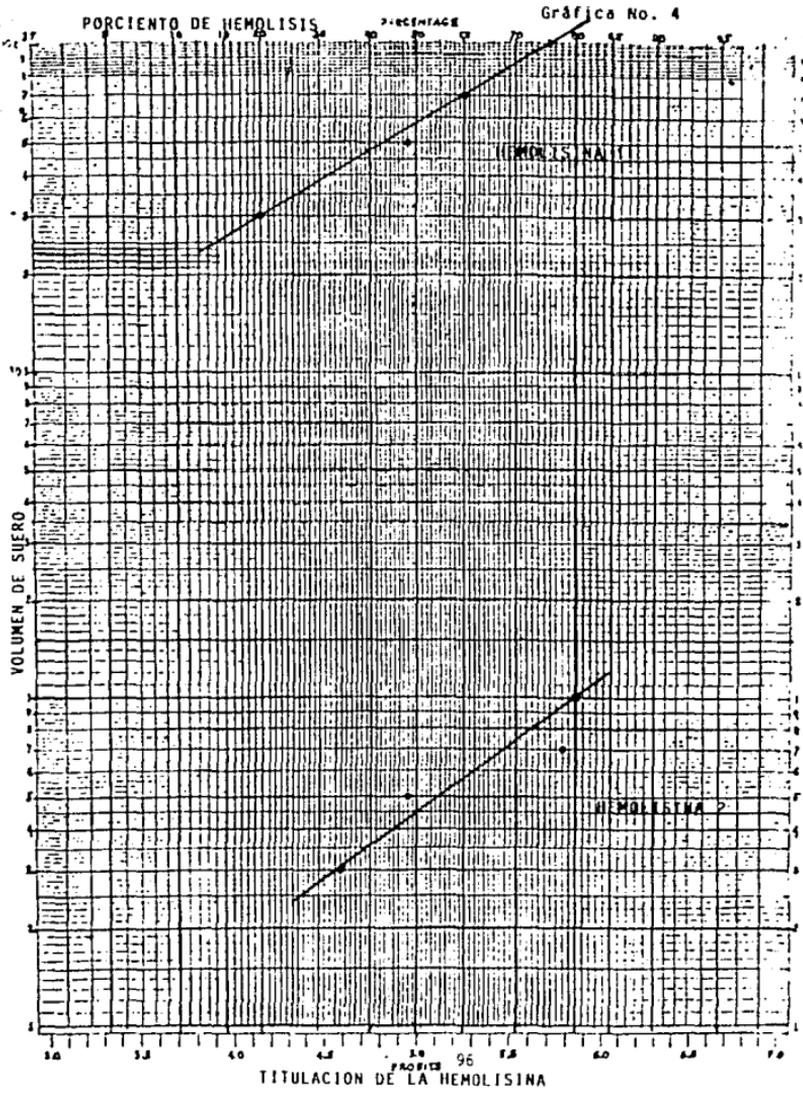
E)

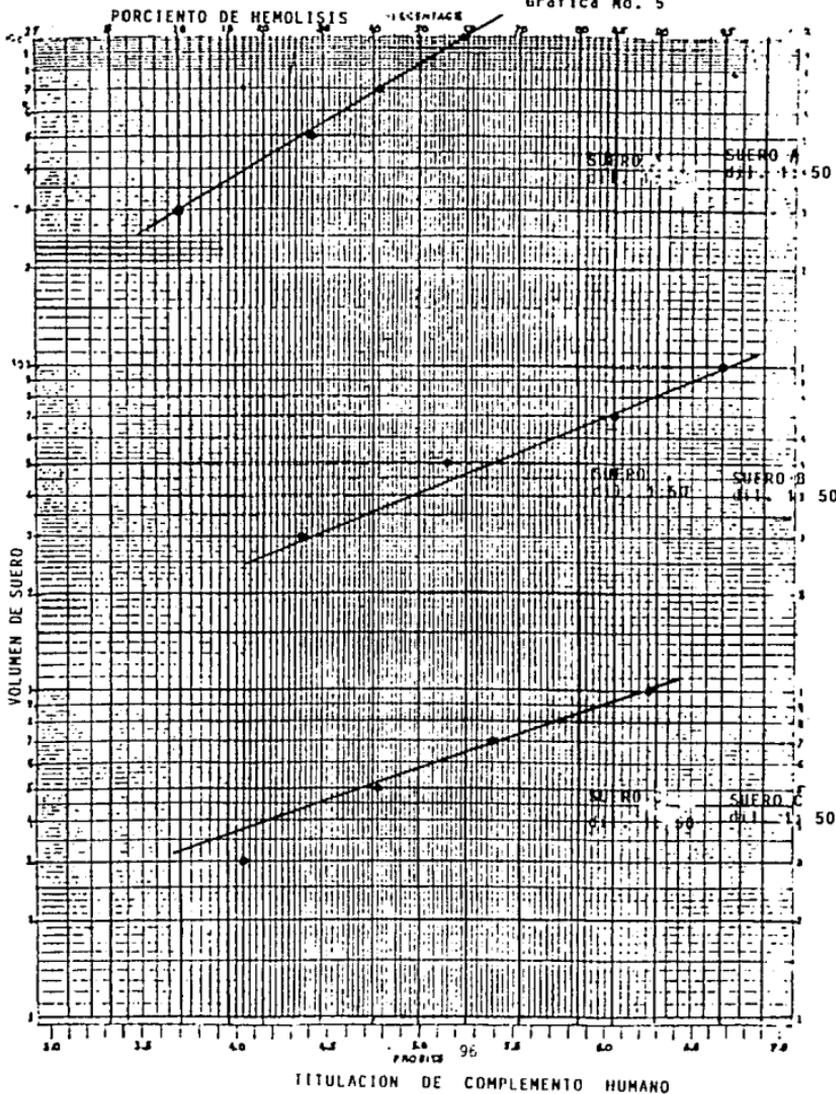
TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.45	0.46	0.39	1.0	94	96	81
2	0.47	0.43	0.28	0.7	98	89	58
3	0.46	0.40	0.11	0.5	96	83	23
4	0.38	0.22	0.07	0.3	79	46	14

F)

TUBO	ABSORBANCIA			VOLUMEN SUERO	% HEMOLISIS		
	1:25	1:50	1:100		1:25	1:50	1:100
1	0.47	0.45	0.33	1.0	98	94	69
2	0.42	0.41	0.24	0.7	87	85	50
3	0.41	0.34	0.14	0.5	85	71	29
4	0.40	0.17	0.05	0.3	83	35	10

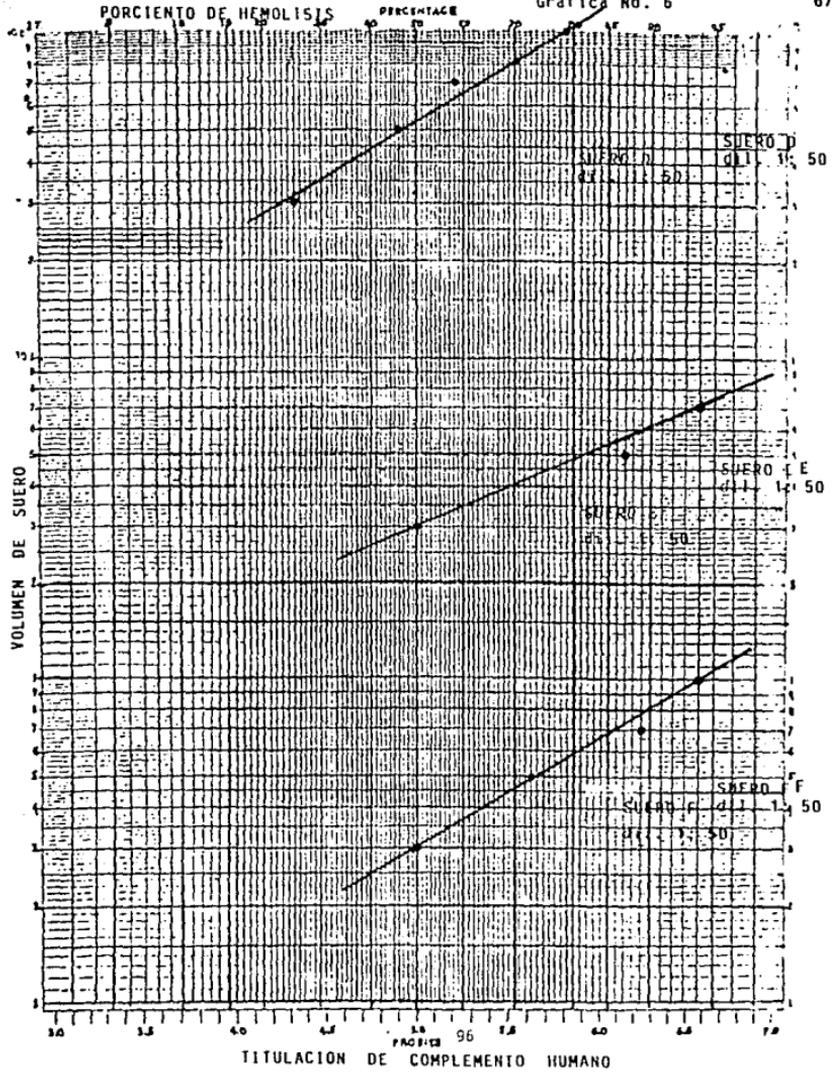
Ver gráfica No. 7, 8.



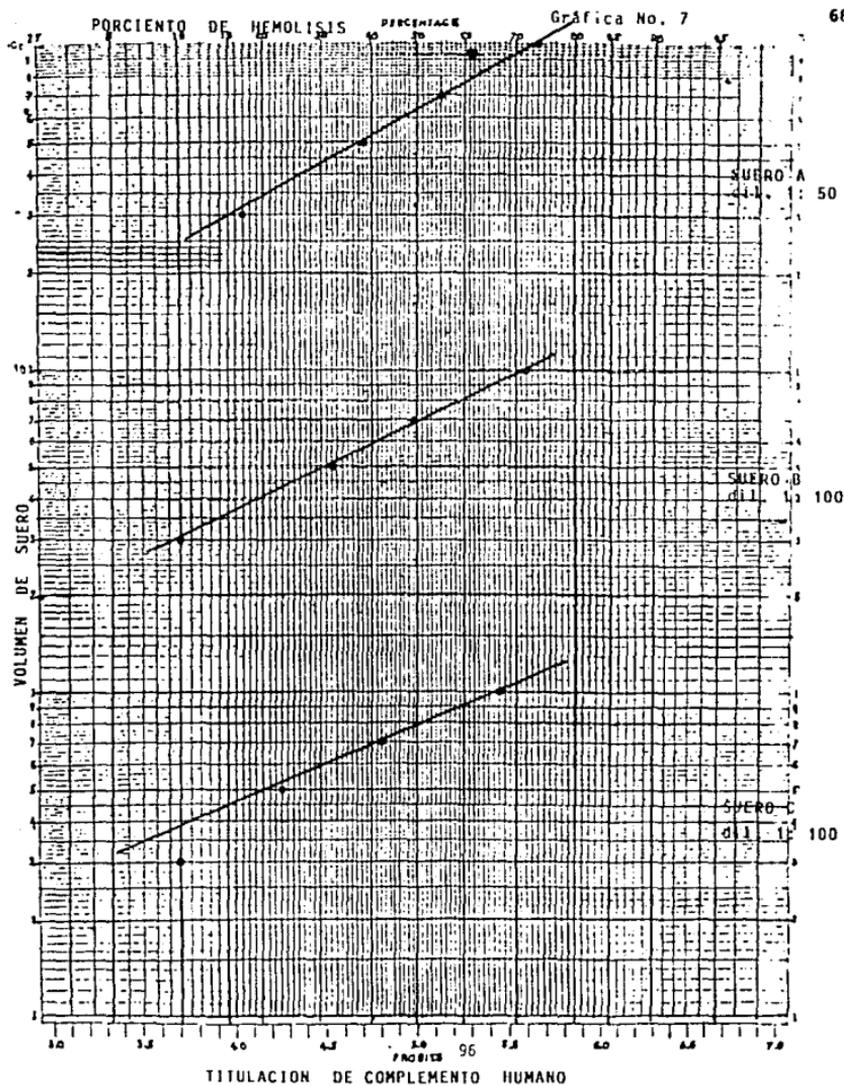


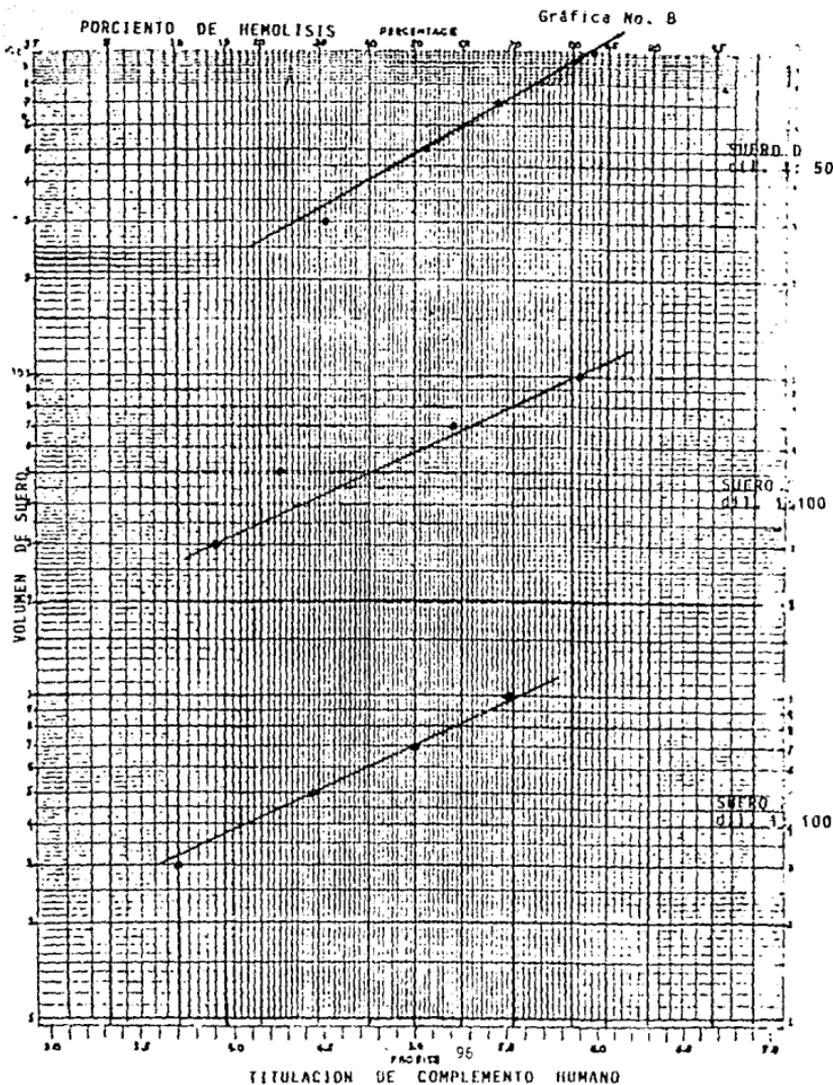
TITULACION DE COMPLEMENTO HUMANO

Gráfica No. 6



TITULACION DE COMPLEMENTO HUMANO





T A B L A 10
TITULOS CH50 EN SUERO HUMANO CON HEMOLISINA DE PERRO

SUERO	VOLUMEN ml.	UCH /ml 50	DILUCION	UCH /ml 50
A	0.85	1.17	1.50	58.8
B	0.85	1.17	1.100	117.6
	0.4	2.5	1.50	125
C	0.58	1.72	1.50	86.2
D	0.54	1.85	1.50	92.6
E	0.58	1.72	1.100	172.41
	0.3	3.3	1.50	166
F	0.64	1.56	1.100	156
	0.3	3.3	1.50	166

HEMOLISINA 2

SUERO	VOLUMEN ml.	UCH /ml 50	DILUCION	UCH /ml 50
A	0.64	1.56	1:50	78.1
B	0.68	1.47	1:100	147
	0.37	2.7	1:50	135.1
C	0.8	1.25	1:100	125
	0.4	2.5	1:50	125
D	0.48	2.08	1:50	104.2
E	0.56	1.78	1:100	178
F	0.7	1.42	1:100	142
	0.35	2.85	1:50	142.8

VIII. ANALISIS DE RESULTADOS

1. Para la preparación de los medios de cultivo, inicialmente se probó una concentración de sangre del 5%, pero no se consideró adecuada, ya que después de la incubación de las cepas, la hemólisis no era muy nítida, por lo que se optó por una concentración del 3%, ya que con esta resultó más fácil la detección de la hemólisis.

2. En la Tabla 1 se observa la utilidad de la sangre de perro en Microbiología, donde se obtuvo una hemólisis beta de las cepas de Streptococcus pyogenes, Estreptococo hemolítico no tipificado, así como en la cepa de Bacillus cereus; en estas se observó más clara la hemólisis en Agar Sangre de Perro (ASP).

Además se observó que después de la incubación de las placas, si estas se almacenaban en refrigeración por lo menos 24 horas, la hemólisis se revelaba más nítidamente.

3. En cuanto a la morfología colonial y microscópica de las cepas sembradas, se observó que tanto en ASP como en ASC las colonias de las cepas son semejantes y corresponden a la reportada en la Bibliografía.

4. Cuando se utiliza Telurito como medio de diferenciación de cepas impregnadoras de este, en ambos medios se encontró una utilidad semejante. (Tabla 1 A)

5. Según la Tabla 2 en la siembra comparativa de Muestras Clínicas como Exudados Faríngeos, Oícos, Vaginales, Nasaes y Urocultivos en ASP y ASC se encontró que los resultados fueron similares, además de que se observó una mayor sensibilidad a la hemólisis por parte de los eritrocitos de Perro .

De las colonias beta hemolíticas con características de estreptococos (puntiformes, convexas, opacas, color blanco grisáceo), se observaron 12 en ASP y sólo una en ASC, se realizó frotis con tinción de Gram y prueba de catalasa, obteniéndose 11 catalasas positivas para las colonias beta hemolíticas en ASP y sólo una catalasa negativa que coincidió con la de ASC, todos se observaron como cocos gram (+) en la tinción de Gram.

6. En las muestras para Urocultivos se obtuvieron 4 muestras contaminadas con más de dos tipos Bacterias en ambos medios, esto fue debido a una mala toma de muestra.

7. En la Tabla 3 se muestran los esquemas de inmunización utilizados en perros para obtener sueros:

Anti- Glóbulos rojos de rata.

Anti- Glóbulos rojos de carnero.

Anti- Glóbulos rojos humanos.

Para la obtención de buenos títulos (1:2048) se requirió extender el esquema original con 2 inmunizaciones más.

En la Tabla 4 se observa que los glóbulos rojos de rata son buenos inmunógenos para el perro, no así los de humano y carnero, que aún después de ampliar el esquema quedaron con títulos muy

bajos.

8. En los conejos los resultados fueron un poco contrastantes, donde uno de los sueros de los conejos inmunizados dió un título anti- GRP de 1:2048 y el otro de 1:4096, en esto pudieron afectar factores tales como la genética de los conejos, la eficiencia en procesos de inmunización, edad, sexo, etc. Sin embargo pueden considerarse como muy buenos títulos.

9. Para la titulación del antisuero GR rata la titulación en placa no era visible, ya que no se observaba ni en el testigo el botón de eritrocitos, ni en ningún pozo hemblisis, por lo que esta prueba se realizó por Hemaglutinación en tubo.

10. En la Tabla 5 se presentan los volúmenes de antisueros a obtener de los perros, observándose que de estos se pueden obtener hasta 400 ml, sangrando a blanco, en esto hay que tomar en cuenta primordialmente el peso y el tamaño del perro, esto es de importancia cuando se requiere de sueros en grandes volúmenes, como por ejemplo, para el empleo en el diagnóstico clínico, antisueros antipanzosmos, vacunas.

11. En el caso de los conejos los volúmenes fueron más pequeños, pero los títulos muy buenos.

12. En la Tabla 6 se observan los datos de la Gráfica No. 1 para la obtención de la curva de precipitación, en la cual se representa la zona exceso de Anticuerpo.

13. La técnica de Jerne nos sirve para medir la respuesta humoral (número de células formadoras de anticuerpos contra antígenos), y en nuestro trabajo al utilizar ratones blancos inmunizados con GRP se observan hasta 176000 células formadoras de anticuerpo; sin embargo esto no fue fácil, ya que para poder obtener estos resultados se hicieron varios intentos de los cuales se experimentó que no es conveniente usar eritrocitos viejos, ya que estos se lisan muy fácilmente.

Cuando se usa suero de conejo como fuente de complemento todas las placas de GRP se lisan, esto pudo deberse, a que tal vez estos tienen algún antígeno, sobre el cual el suero de conejo actúa, lisándolos, ya que en las placas de GRC si se observaron placas hemolíticas.

Los resultados expuestos en la Tabla 7 se lograron usando suero fresco de cobayo como fuente de complemento. En la dilución 1:20 se usó un suero de cobayo congelado, diluido 1:3, y este produjo la lisis total en las tres primeras placas, en cambio con GRC a esta misma dilución se revelaron muy nítidamente las placas líticas.

14. La titulación de la hemolisina, Tabla 10, tiene como finalidad la estandarización de la técnica de CH⁵⁰ y la técnica de Fijación de Complemento; esta última muy útil en el diagnóstico de diversos procesos infecciosos.

De los antisueros obtenidos de conejos contra GRP se observó que al querer usar suero humano como fuente de complemento en la

titulación no es muy eficaz, ya que no produce la lisis total.

La fuente de complemento más adecuada fue el suero fresco de cobayo, con el cual se cuantificaron títulos muy buenos en las dos hemolisinas obtenidas.

15. En la Tabla 9 se reportan los valores de CH para cada paciente sano, usando las dos hemolisinas. 50

Así en la Tabla 10 se reporta la concentración de complemento para suero, detectando que en la mayor parte de los resultados, en la Hemolisina 1, los valores son más bajos que los obtenidos con la Hemolisina 2, para un mismo suero, habiendo diferencias hasta de 20 unidades.

Resultados tan diferentes podrían deberse a un mal manejo de muestras, a la cantidad de hemolisina utilizada para la sensibilización, el tiempo para detener la reacción; etc.

Pero aún así la cuantificación del complemento se puede decir que fué exitosa; y la mayoría de los pacientes caen dentro de los valores normales (100 - 150 UCH); exceptuando el suero A, y el suero E que tuvo valores un tanto elevados con las dos hemolisinas. 50

IX. CONCLUSIONES

1. El ASP se puede utilizar de igual manera que el ASC en la preparación de medios de cultivo, tomando en cuenta que las cepas no presentan cambios en su morfología macroscópica y microscópica, además de que la observación de hemólisis es muy clara; uso primordial de este medio, además de que la concentración de sangre usada en el medio es mínima.

Así también su uso es adecuado en muestras clínicas, ya que el aumento en la sensibilidad de los eritrocitos es benéfica para la identificación de una beta hemólisis, no siendo ninguna desventaja las pruebas de catalasa y tinción de Gram, ya que estas son rutinarias en el Laboratorio de análisis.

2. El perro es una buena fuente para la producción de antisueros por su apreciable respuesta inmunitaria, y la alta obtención de volúmenes. En especial su gran susceptibilidad inmunogénica a los glóbulos rojos de rata, por los excelentes títulos.

3. En la técnica de Jerne lo más recomendable al hacer uso de GRP es el empleo de eritrocitos nuevos y suero fresco de Cobayo, para la cuantificación en placa.

4. Los altos títulos en la Hemolisina indican que los GRP son muy buenos inmunógenos; así también se apreció que es muy recomendable en la titulación de la hemolisina el uso de suero

fresco de Cobayo.

5. En la cuantificación de Complemento 50% hemolítico en suero de pacientes. Los resultados son muy variantes, pero estos indican que si es útil la Hemolisina anti GRP.

Por lo que se puede ver está técnica y todas las demás lo que necesitan es la Estandarización, ya que la utilidad de la sangre de perro en técnicas Microbiológicas e Inmunológicas fue comprobada, resultando ser muy satisfactoria.

Se propone además hacer un seguimiento más profundo del perro en otras aplicaciones como pudieran ser la obtención de factores de la coagulación, pruebas de toxicidad, etc; y ampliar el trabajo sobre todo en la parte Clínica

X. BIBLIOGRAFIA

- 1) Pairó, D.J.L., Tratado de Zoología Canina, Editorial Era - Chávez Hnos. y Cia. S.A., 1^a edición, México, D. F. (1981)
- 2) Mayer, M.M., In Experimental Immunochemistry; Eds. Kabat E.A. & Mayer M.M., 2nd edn., Charles C. Thomas, Springfield, Ill., U.S.A., (1964)
- 3) Coombs, R.R.A., & Fiset, M.L., Detection of complete and incomplete antibodies to egg albumin by means of a sheep red cell - egg albumin antigen unit., Brit. J. exp. Path., 35: 472 (1954)
- 4) Boy den S.V., The absorption of proteins on erythrocytes treated with tannic acid and subsequent hemagglutination with antiprotein sera, J. exp. Med. 93: 107 (1951)
- 5) Cua - Lim F., Richter, M. & Rose B., The reversed BDB technique. The agglutination of antibody coated red cells by homologous antigen. J. Allergy, 34: 142 (1963)
- 6) Segre, D., Detection of hog cholera virus by hemagglutination test. Amer. J. Res. 23: 748 (1962)
- 7) Steele, A.S.V. & Coombs, R.R.A., The red cell linked antigen test for incomplete antibodies to soluble proteins, Int. Arch. Allergy. 25: 11 (1964)
- 8) Felton, F.G. & Scott L.V., Studies on hemagglutination with herpes simplex virus. II. The factors involved in the technique, J. Immunol., 86: 42 (1961)

- 9) Neter, E., Lee, F.B., Zak, D.A., Murdock, M.R. & Arbesman, C.E., Studies on hemagglutination and hemolysis by Escherichia coli antisera, J. exp. Med. 96: 1 (1952)
- 10) Wright, G.G. & Feinberg, R.J., Hemagglutination by tularemia antisera: Further observations on agglutination of polysaccharide - treated erythrocytes and its inhibition by polysaccharide, J. Immunol. 68: 65 (1952)
- 11) Ley, A.B., Harris, J.P., Brinkley M., Liles B., Jack J.A., & Cahan A., Circulating antibody directed against penicillin, Science 127: 1118 (1958)
- 12) Bellanti, J.A., Inmunología, Ed. Interamericana, 3^a edición, Mexico, D.F., (1986)
- 13) Stites, P.D., Fudenberg, H.H., Inmunología Básica y Clínica, Ed. El Manual Moderno, 5^a edición, México, D.F., (1985)
- 14) Jerne, N.K., Nordin, A.A., Plaque Formation in Agar by Single Antibody - Producing Cells, Science, 140: 405 (1963)
- 15) Cunningham, A.J., A Method of Increased sensitivity for detecting Single Antibody - Forming Cells, Nature, 207: 1106 (1965)
- 16) Sterzl, J., Riha, I., Detection of cells producing 7S Antibody by the Plaque Technique., Nature 208: 1106 (1965)
- 17) Dresser, D.W., Wortis, H.H., Use of an Antiglobulin serum to detect cells producing Antibody with Low Haemolytic Efficiency, 208: 44 (1965)
- 18) Golub, E.S., Mishell, R.J., Weigle, W.O., and Dutton, R.W., A Modification of the hemolytic plaque assay for use with protein

- antigens, *J. Immunol*, 100: 133 (1968)
- 19) Strausbauch, P., Sulica, A., Givol, D., *General Method for the Detection of Cells producing Antibodies against Haptens and Proteins Nature*, 227: 44 (1970)
- 20) Difco Manual, Dehydrated Culture Media and Reagents for Microbiology, Difco Laboratories, Tenth Edition, Detroit Michigan 48232, U.S.A., (1984)
- 21) Manual Bioxón, Medios de Cultivo y Reactivos de Diagnóstico, BIOXON de México, S.A. de C.V.
- 22) Braude, A.I., *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana 1^a edición, Argentina, (1984)
- 23) Cowan, S.T., *Manual para la identificación de Bacterias de importancia Médica*, Editorial Continental, 2^a edición, México, D.F. (1985)
- 24) Jawetz, E., Melnick, J.L., Adelberg, E.A., *Microbiología Médica*, Editorial El Manual Moderno, 12^a edición, México, D.F., (1987)
- 25) Koneman, E.W., *Diagnóstico Microbiológico*, Editorial Médica Panamericana, 1^a edición, Argentina, (1983)
- 26) Lenette, E.H., *Microbiología Clínica*, Editorial Médica Panamericana, 3^a edición, Argentina, (1983)
- 27) Rodarte, G.C., *Memoria del curso: LA TECNICA DE LA LIOFILIZACION*, Instituto de Capacitación en Especialidades, S.C., México, D.F., (1981)