

720375



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"DESARROLLO DE UN METODO SENCILLO PARA LA  
INVESTIGACION DE ANTICUERPOS EN LA  
ALVEOLITIS ALERGICA"



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

T E S I S

Que para obtener el Título de  
QUÍMICO FARMACEUTICO BIÓLOGO  
p r e s e n t a  
ISAAC CALDERON KLEIMAN



México, D. F.

1990



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE PROF: SALVADOR MARTIN SOSA.  
VOCAL PROF: SATURNINO DE LEON CHAPA.  
SECRETARIO PROF: JOSE SULIVAN LOPEZ GONZALEZ.  
1er. SUPLENTE PROF: ANA ESTHER AGUILAR CARDENAS.  
2do. SUPLENTE PROF: GUILLERMO GONZALEZ VILLAMAR.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

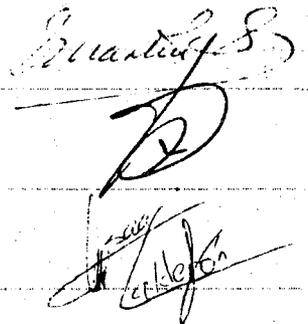
LABORATORIO DEL GRUPO SEPE DE INVESTIGACIONES BIOLOGICAS.  
SERVICIO DE ALERGIA DEL HOSPITAL GENERAL DE LA SECRETARIA DE  
SALUD.

ASESOR: D.F.G. SALVADOR MARTIN SOSA.

SUPERVISOR

TECNICO: D.B.P. SALOMON CALDERON NANES.

SUSTENTANTE: ISAAC CALDERON KLEIMAN.



Three handwritten signatures are present on the right side of the page, each written over a horizontal dashed line. The top signature is 'Saturnino de Leon Chapa', the middle one is 'Jose Sulivan Lopez Gonzalez', and the bottom one is 'Guillermo Gonzalez Villamar'.

## DEDICATORIA

A mis padres con todo el cariño y agradecimiento por haberme formado y criado en un hombre de bien.

A mis hermanos ARIEL, LALO Y JORGE por todo el apoyo y cariño recibido por ustedes.

Con todo mi amor a mi novia y futura esposa IVONNE por tu constante impulso y tenacidad hacia mi.

A mis abuelos Enrique, Isaac, Rosita Y Graciela con mucho cariño.

Al Dr. Salomón Calderón Manes por todo lo que hizo por mi para la realización de este trabajo.

Al profesor Salvador Martín Sosa por su asesoramiento durante la Tesis.

Con mucho respeto y agradecimiento al Dr. Trejo ya que sin él no hubiera sido posible este momento.

A los Ingenièros Jorge Hernández, Eduardo Bravo y Héctor Cárdenas por creer en mi y darme todo el apoyo necesario para haber llegado hasta este punto.

Al Lic. David Pantoja por toda su ayuda y apoyo brindado desde un principio.

A la Señora Maria Esther Hernandez con gran cariño y agradecimiento.

Con mucho afecto para Victor, Eugenia, Jaquie, Michael, Tiburcio, Edith y Salomón, por su cariño demostrado.

A mis sinodales por su ayuda en la terminación de este trabajo.

A mis amigos y compañeros.

A la Facultad de Química.

A la Universidad.

Y a DIOS por todo.

INDICE.

INTRODUCCION.....	1
CAPITULO 1.....	3
CAPITULO 2.....	19
RESULTADOS.....	22
CONCLUSIONES.....	35
RESUMEN.....	37
ANEXO 1.....	38
ANEXO 2.....	57
BIBLIOGRAFIA.....	61

## INTRODUCCION.

Existe un padecimiento de las vias respiratorias, muy común entre la gente que está en contacto constante con aves o con sus desechos fecales denominado "Alveolitis Alérgica Extrinseca", el cual fue descrito por vez primera por Bernardini Ramazzini, en 1700, de la siguiente manera:

"de aquí, siempre que es necesario cribar el trigo, la cebada u otros granos semejantes, la tierra del molino o cuando los comerciantes de granos los miden o transportan aquí y allí, los hombres quienes criban y miden son plagados completamente por el polvo cuando ellos trabajan diciendo innumerables maldiciones durante su trabajo. En la garganta, pulmones y ojos es de sobra conocido que hay lesión seria; en la garganta se asfixia y se reseca con el polvo y el resultado es una sequedad y tos obstinada; los ojos están muy inflamados y llorosos y casi todos quienes hacen esta vida de cribar o manejar granos están con respiración corta y caquética y raramente llegan a viejos; en efecto es muy fácil que ellos caigan en ortopnea y finalmente en la hidropesia" (6).

Es de observarse en esta primera descripción que la Alveolitis Alérgica Extrínseca es producida por la inhalación de polvos orgánicos. Después se definió como pulmón del granjero ya que atacaba principalmente a los granjeros. El padecimiento también es muy común entre la gente que está en contacto con aves y sus antígenos (17).

El presente trabajo experimental tiene como finalidad el poder desarrollar un método más sensible, económico y de fácil realización que los de precipitación en gel, pruebas cutáneas y precipitación en capilar, tales como las técnicas de hemaglutinación indirecta, aglutinación con partículas de carbón activado y la reacción de fijación en superficie.

El objeto de hacer un método económico y sensible, es con el fin de tener un diagnóstico eficaz sin necesidad de recurrir a aquellos más sensibles pero de costo elevado como son: la contraelectroforesis, las técnicas inmunoenzimáticas y las de reactivos radioactivos, que requieren de equipo bastante inalcanzable en cuanto a precio y reactivos para las instituciones de salud.

## CAPITULO 1

GENERALIDADES.

## 1.1.- "ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA"

La inhalación de polvos orgánicos se asocia con dos tipos distintos de reacción pulmonar. La más común, es mediada por anticuerpos clase IgE usualmente referida como hipersensibilidad Tipo I o anafiláctica.

Esta respuesta causa un daño en las vías aéreas y se asocia frecuentemente con antecedente de alergia y predisposición genética. La reacción Tipo I se presenta en minutos por lo que también se ha convenido en llamarle respuesta inmediata (1,2,3,4).

El segundo caso menos frecuente afecta el intercambio de gases en el pulmón y se denomina Alveolitis Alérgica Extrinseca o también conocida como Pneumonitis por hipersensibilidad, la cual es mediada por anticuerpos clase IgG usualmente referida como respuesta Tipo III (5).

Este padecimiento fue descrito primero por Bernardini Ramazzini, en 1700 (6), Campbell en 1932, lo señala con el nombre de "pulmón del granjero"; Studer, en 1950 y Seal en 1969, lo citan como una fibrosis quística con pérdida de la arquitectura bronco-pulmonar (7). En 1961, ésta entidad se considera como un padecimiento pulmonar debido a la inhalación de polvo, hongos o de productos vegetales, caracterizado por síntomas y signos atribuibles a la reacción en las partes

periféricas del aparato respiratorio, que ocasionan un elevado déficit en el intercambio gaseoso (8).

La reacción inmunológica se presenta de cuatro a ocho horas después de la exposición al antígeno mencionado (10).

La variedad de polvos orgánicos y las esporas de hongos que pueden producir este padecimiento, es muy grande. Este padecimiento es producido con relativa frecuencia por excremento de palomas, pichones y otros antígenos que se inhalan en los lugares de trabajo o por hongos que se desarrollan en los aparatos de aire acondicionado (21).

#### Datos clínicos:

Los síntomas pueden ser agudos, insidiosos y crónicos.

Estado agudo, se presenta a las cuatro u ocho horas después de la exposición al antígeno causal. El ataque se caracteriza por malestar general, fiebre elevada de tipo influenza y calosfrio nocturno, mialgias y pérdida de peso (10 a 20 kgs), los síntomas pulmonares son: disnea de esfuerzo, tos seca o con expectoración mucopurulenta, sensación de opresión torácica, raramente reacción de tipo asmático (pulmón del granjero), con estertores bronco-alveolares en las bases y signos de broncoespasmo. El examen radiológico puede ser normal o con algunas imágenes micronodulares, infiltración difusa, afectando especialmente la parte media e inferior de los campos pulmonares. La mejoría se presenta cuando el paciente se retira de este ambiente y vuelve cuando se expone al polvo agresor. El examen radiológico vuelve a la normalidad (5,10,11).

En ocasiones, después de la exposición al polvo, el paciente presenta tos aislada, febrícula, disnea de esfuerzo y pérdida de peso (5,10,11).

La sintomatología crónica, es de insuficiencia respiratoria, similar a la de la fibrosis intersticial difusa, caracterizada por tos, disnea de esfuerzo continua, cianosis y estertores alveolares basales (18). La radiología sugiere fibrosis difusa y pueden presentarse datos de enfisema obstructivo (5,10,11).

El laboratorio demuestra en algunos casos agudos leucocitosis con eosinofilia y sedimentación normal. En la expectoración se observan eosinófilos. Los gases en la sangre arterial muestran hipoxemia e hiperventilación; el pH se encuentra compensado (4).

Las pruebas cutáneas con el antígeno causal, son la mayoría positivas (5,11).

La demostración de los anticuerpos precipitantes en el suero de estos pacientes con alveolitis alérgica extrínseca, contra antígenos de aves, fue hecha primero por Pepys, quien los observó en más del 90% de los pacientes; esta última prueba puede ser definitiva en el diagnóstico del padecimiento (5,10,11,12,13,14,15,16,17).

El examen histopatológico del tejido pulmonar revela lesiones en la pared alveolar y los bronquiolos, el cuadro patológico varía de acuerdo con el estado del padecimiento (7).

En el estadio agudo, el cuadro histopatológico se

caracteriza por nódulos granulomatosos de tipo sarcoides (2) y un infiltrado inflamatorio intersticial a nivel de la pared alveolar. En el estadio crónico, el cuadro histopatológico es igual al que presenta el estado insidioso, y se observa siempre un grado de infiltración inflamatoria intralveolar, con tendencia a la fibrosis y bronquitis obliterante. En el estadio avanzado, la fibrosis peribronquial, produce alteraciones de la arquitectura pulmonar, con dilataciones del alveolo (enfisema irregular) o presencia de quistes pseudoquistes, especialmente en el lóbulo superior (1,5,7,10,11).

La sospecha del padecimiento debe existir en personas que tienen aves y síntomas respiratorios. Un factor importante para el diagnóstico es la presencia de los síntomas después de la exposición en el lugar donde se encuentran las palomas y desaparición de los mismos después de un periodo de ausencia de ese lugar (5,10).

En apoyo al diagnóstico clínico deben existir las pruebas funcionales respiratorias con demostración de la difusión, restricción y en algunos casos obstrucción bronquial; los rayos X muestran infiltrado multifocal o difuso, anormalidades que pueden desaparecer con el aislamiento del paciente.

En todos los casos en los que se sospeche el padecimiento deberán buscarse anticuerpos precipitantes en el suero y con pruebas cutáneas usando los antígenos sospechosos (5,11).

Muchas de las partículas antigénicas que producen este padecimiento son muy parecidas entre si hablando

inmunológicamente (15) , lo que es un punto de considerable importancia por el hecho de que producen una alveolitis granulomatosa intensa. Por ejemplo, ha sido demostrado bajo condiciones experimentales que los actinomicetos termofílicos son la fuente principal de antígeno en diferentes formas de pneumonitis hipersensible, incluyendo el pulmón de granjero, tienen el mismo efecto en la producción de anticuerpos y particularmente en la hipersensibilidad mediada por células.

Esta comprobado que muchos de estos polvos orgánicos activan la vía alterna del complemento "in vitro", y se cree que muchos de los infiltrados neutrofílicos pulmonares no específicos tempranos, están basados en la activación del complemento por esta vía.

Sin embargo, esta propiedad no específica del polvo orgánico, no es de particular ayuda en el diagnóstico de este padecimiento.

En el examen del paciente, las siguientes características son de gran ayuda en el diagnóstico: altos niveles de anticuerpos precipitantes contra el polvo orgánico agresor, en cantidades suficientes para ser detectadas por un simple Ouchterlony de doble difusión cuando el antígeno ha sido identificado apropiadamente.

Muchas técnicas más sensibles como sería el ELISA, radioinmunoensayo, fijación de complemento y contrainmunolectroforesis, han sido probadas de ser lo suficientemente sensibles para la detección de anticuerpos en

todos los pacientes, incluso en los aquellos asintomáticos.

Las pruebas cutáneas pueden ser útiles como parte del diagnóstico en la evaluación de ciertas formas de hipersensibilidad, tales como la enfermedad de los criadores de palomas.

#### 1.2.- "TIPOS GENERALES DE DAÑO INMUNOLOGICO"

Tipo I.- Las pruebas cutáneas con reacción inmediata son demostradas en el 80% de los pacientes, pueden ser mediadas por IgE o por IgG4 y asociadas con reacciones asmáticas en pacientes con inhalación controlada (32,33).

Tipo II.- En esta respuesta se sugiere que los antígenos inhalados pueden ser incluidos en las membranas celulares pulmonares, conduciendo a una reacción mediada por anticuerpos IgM o IgG, con activación del complemento, lo que ha sido demostrado en biopsias pulmonares por inmunofluorescencia (32,33).

Tipo III.- Esta mediada por anticuerpos IgG precipitantes, hemaglutinantes y que consumen complemento; estos anticuerpos se encuentran elevados, actuando de una manera específica y coincidente con la exposición y el daño al tejido (30,32).

Tipo IV.- Esta reacción esta mediada por células blancas

no por anticuerpos, esta reacción también recibe el nombre de respuesta tardía ya que en las pruebas cutáneas tarda de varias horas a días en presentarse la respuesta, e involucra un mecanismo más complejo y más lento de llevarse a cabo (32,33).

En el caso de la Alveolitis Alérgica Extrínseca, el cuadro clínico no es semejante al clásico encontrado en las enfermedades mediadas por IgE como es el asma bronquial extrínseco; sin embargo se sugiere que las reacciones mediadas por IgE, a través de sus mediadores vasoactivos pueden facilitar la localización y atrapamiento de complejos inmunes en las paredes y membranas basales y, así iniciar la respuesta de Tipo III.

### 1.3.- " DIAGNOSTICO DE LA ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA "

Para su diagnóstico el médico se apoya en el resultado de las pruebas de laboratorio, debido a esta razón son de gran importancia los reportes de éste.

Existen diversas técnicas de laboratorio. pero las más sensibles son de un alto costo; requieren de equipo especializado y de reactivos de difícil alcance en el país.

Dentro de estos métodos están: ELISA, el radioinmunoensayo, la contrainmunolectroforesis, y las técnicas de inmunofluorescencia (34).

Estos métodos son de una gran sensibilidad pero

desafortunadamente son muy costosos, por lo que no se aplican en cualquier laboratorio de análisis clínicos, además, los laboratorios que cuentan con los equipos muchas veces tienen dificultad para encontrar los reactivos necesarios, ya que la mayoría de estos son producidos por casas comerciales del extranjero, y aquellos que son de procedencia nacional no siempre cumplen con las normas y especificaciones necesarias para un buen diagnóstico.

Por otro lado, la alveolitis alérgica extrínseca la padecen en su mayoría gente del campo, que es la que se encuentra en contacto con las aves, ese tipo de individuos es de bajos recursos económicos por lo que no pueden pagar en un laboratorio clínico particular un diagnóstico con estos métodos costosos por lo que recurren a las clínicas de asistencia social en donde por lo general no se cuenta con estos.

En estas clínicas se utilizan otros métodos los cuales no son muy costosos pero tampoco son muy sensibles.

Dentro de estos métodos se encuentran: la precipitación en gel, la precipitación en capilar, la doble difusión radial y las pruebas cutáneas(31).

Estos métodos de diagnóstico aunque son de rápida realización, cuentan con desventajas que pueden alterar los resultados, estas desventajas son: en las precipitaciones en capilar nos encontramos con el fenómeno de zona, en el que al no existir concentraciones equivalentes del antígeno con el anticuerpo no se forman la precipitación, esto nos conduce a un

falso negativo que repercute sobre el tratamiento del paciente, en la doble difusión radial, existe el problema de no controlar bien la temperatura y ocasionar falsas bandas debidas a precipitaciones de sales, además de su sensibilidad baja.

Otro de los problemas con los que cuenta esta forma de diagnóstico es que en las clínicas rurales no se practica y por lo tanto la persona tenga que viajar hasta las grandes urbes para su diagnóstico.

El médico para poder dar un diagnóstico final de un padecimiento se necesita basar en las pruebas de laboratorio, en el historial clínico del paciente y en su experiencia propia.

El estudio radiológico no siempre es de gran utilidad y especialmente en este padecimiento ya que puede ser confundido con una tuberculosis miliar (8).

Dentro del historial clínico del paciente; el médico debe tomar en cuenta la zona de residencia, el trabajo que realiza el paciente y si convive con aves de alguna especie o si por la zona existen aunque el no entre en contacto directo con ellas.

Al finalizar toda la serie de estudios realizados sobre el paciente este queda muy lastimado, ya que también se les practican pruebas cutáneas que muchas veces terminan con necrosis parcial del tejido.

Debido a todo lo anteriormente descrito y a los problemas de diagnóstico con los que se tropieza el médico, el

laboratorio y el paciente, surge la necesidad de crear nuevos metodos que cumplan con los siguientes requisitos: que sean de gran sensibilidad, de bajo costo, de sencilla y rápida realización, que sean de fácil alcance y que cualquier persona especializada los pueda llevar a cabo; que los reactivos puedan ser utilizados en los laboratorios de las clinicas rurales no necesitando de equipo altamente especializado y que evite en lo más posible el daño físico del paciente.

Cumpliendo con las condiciones anteriores, habremos realizado un método sencillo de diagnóstico en la Alveolitis Alérgica extrínseca.

### 1.3.- "METODOS PROPUESTOS"

Como un método sencillo de diagnóstico se propone las reacciones de aglutinación indirecta, usando ya sea glóbulos rojos o carbón activado como partículas soporte y el método de fijación en superficie, teniendo las ventajas de no ser complicados ni de costo elevado.

Se han realizado muchos reactivos basandose en las propiedades aglutinantes de los anticuerpos de clase IgG y dado que este padecimiento está relacionado con estos se sugiere la realización de un método que aglutine partículas inertes recubiertas con antígeno (34).

#### 1.3.1.- "AGLUTINACION INDIRECTA"

Las técnicas de aglutinación son tan fáciles de realizar

que es sorprendente lo mucho que han contribuido al conocimiento biológico. A la fecha, la simplicidad de estos métodos es tal que no es necesario un gran conocimiento o experiencia para la correcta interpretación de los resultados. Una lectura correcta requiere únicamente de unos reactivos satisfactorios y unos controles adecuados (35).

La aglutinación ocurre en el momento en el que el antígeno particulado, es expuesto a un anticuerpo apropiado bajo condiciones favorables. Antígenos solubles pueden ser acoplados a partículas acarreadoras inertes. Una aglutinación macroscópica es obvia cuando una fina suspensión de células o partículas empiezan a formar agregados o grumos(35).

La aglutinación es llevada a cabo en dos etapas; el anticuerpo primero se une a su antígeno, y después ocurre la aglutinación. Algunas ocasiones solo ocurre lo primero y entonces el anticuerpo recibe el nombre de "incompleto", dado este caso es necesario recurrir al suero de Coombs para poner de manifiesto la aglutinación. Los aspectos científicos de la combinación entre antígeno y anticuerpo son discutidos por Mellison(36).

Los métodos de aglutinación indirecta pueden utilizar como soportes: glóbulos rojos, partículas de carbón, látex, bentonita, etc.

#### 1.3.2.- "REACCION DE FIJACION EN SUPERFICIE"

Esta reacción tiene como fin el poner en relieve sobre una

superficie, como el papel, una reacción antígeno-anticuerpo.

Para este fin se considera la formación de una red que queda atrapada en los poros del papel en el momento de reaccionar el antígeno con el anticuerpo, esto nos forma un complejo insoluble que es fácilmente teñible con un colorante para proteínas. Si no hubiera reacción entonces quedarían proteínas solubles que en el momento de lavarse se desprenderían de la superficie quedando únicamente una capa lipídica que no se tiñe con el colorante y se observaría un espacio en blanco en el punto de aplicación.

Es necesario tomar en cuenta la velocidad de reacción ya que muchas veces es necesario dejar formarse el complejo por 24h.

#### 1.4.- JUSTIFICACION DE LA PARTE EXPERIMENTAL.

Existen una gran cantidad de métodos de sensibilización de glóbulos rojos, puede ser a pH alcalino como sería utilizando una solución amortiguadora de barbitúratos a pH= 9.6, a pH ácido utilizando mezclas de ácido acético a pH= 3.5, a pH neutro como sería con glutaraldehído a pH= 7.2 (35).

Otra manera de realizar esta sensibilización sería formando enlaces por cargas positivas por medio de sales como el cloruro crómico, ya que a diferente pH podemos desnaturalizar el antígeno, debido a esta razón es necesario realizar pruebas con todos los diferentes métodos (35).

Es de gran importancia para la buena sensibilización de los eritrocitos y su conservación, utilizar formaldehído para tal fin antes de forrarlos de antígeno.

Otro punto importante es el de por medio de un Ouchterlony hacer reaccionar el suero positivo de conejo contra suero de paloma y de pollo para poder observar si existe antigenicidad cruzada y de esa manera poder utilizar el suero de pollo como antígeno, debido a su facilidad de obtención (33).

También es necesario el tripsinizar los glóbulos rojos para poder hacer una digestión parcial de la superficie de estos y

poder unir una mayor cantidad de antígeno.

Otra técnica de aglutinación es utilizar carbón activado como partícula inerte.

Se utilizan métodos de aglutinación debido a que la Alveolitis Alérgica Extrínseca presenta una respuesta de Tipo III, y conociendo las propiedades de la inmunoglobulina IgG, encontramos que es un anticuerpo que puede manifestarse por reacciones de aglutinación (32), en muchos casos es necesario recurrir al suero de Coombs, ya que solo en elevadas concentraciones pueden aglutinar partículas grandes por si solos.

Debido a las dificultades técnicas con las que cuentan los métodos de diagnóstico utilizados hasta la fecha, los cuales son: precipitación en gel, precipitación en capilar y doble difusión radial, es importante la realización de un suero positivo en conejo ya que al no ser confiables las pruebas de laboratorio no se puede tomar como positivo ningún suero de pacientes previamente diagnosticados hasta no haberle corrido las nuevas y viejas pruebas contra un suero control, para la suposición de un paciente con este padecimiento, además de las pruebas de rutina normales es muy importante tomar en cuenta su historial clínico, poniendo especial interés en el hecho de que si vive cerca de aves.

Se realiza también un suero anti-gamma globulina humana para los sueros de los pacientes y un suero anti-gamma globulina de conejo para el suero control.

Una prueba más que se realiza es la de reacción de fijación en superficie.

A un total de 32 sueros de pacientes con diferentes diagnosticos, como son: asma bronquial, alérgia a plumas de aves, Alveolitis Alérgica Extrínseca, tuberculòsis y càncer pulmonar, se les corren las diferentes pruebas, hemaglutinación, carbòn activado, reacción en superficie, precipitación en capilar y precipitación en gel.

Todo esto con el fin de ir descartando métodos hasta obtener el más sensible.

Se escogieron 3 métodos de sensibilización de glòbulos rojos, uno con sales que es el de cloruro cròmico, otro con glutaraldehido a pH neutro y el tercero se hace una combinación de los dos con el fin de observar si se logra un reactivo más sensible (33,34).

De estos tres métodos se va a seleccionar el más sensible.

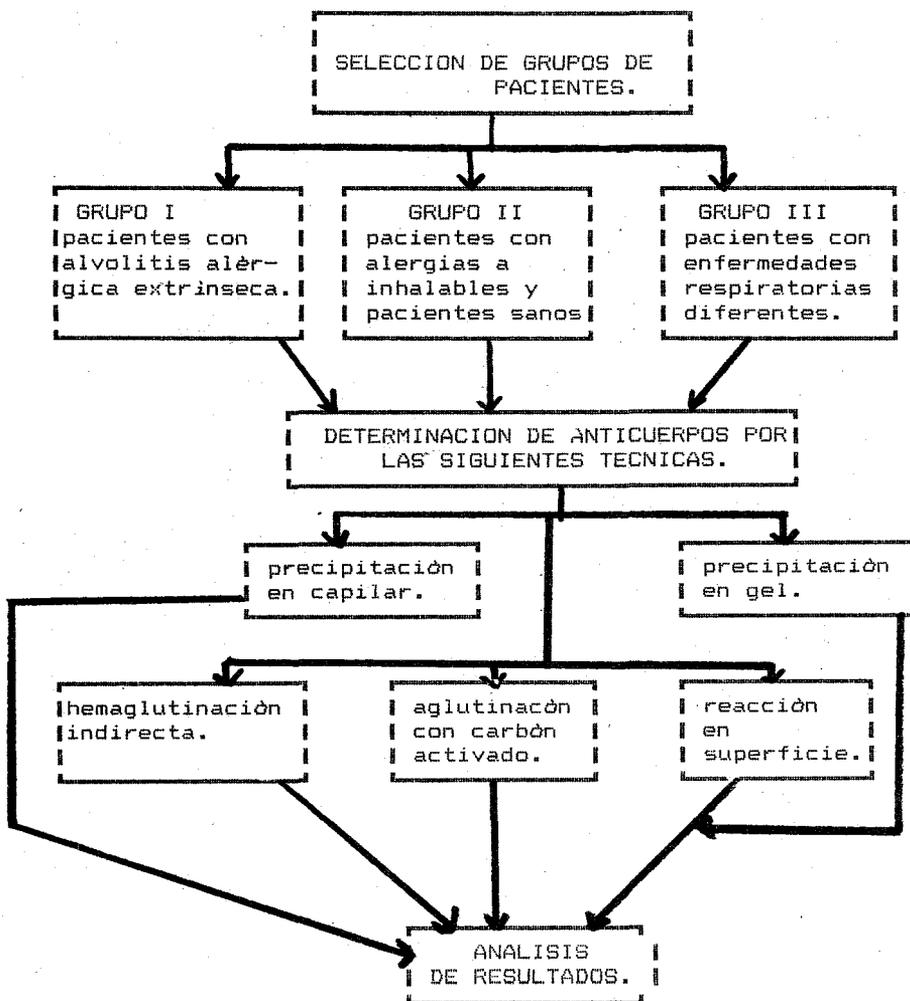
Es de una gran importancia realizar pruebas de estabilidad de los reactivos, tales como: dejar los reactivos constantemente a 37.C y probarlos mensualmente, otro es el de dejar los reactivos a 4 C y probarlos en el mismo tiempo y la tercera y última prueba es el ponerlos a temperatura ambiente y ponerlos a prueba en igual lapso, todo esto con el fin de observar si los reactivos pueden durar un periodo aceptable de tiempo o si no son útiles después de cierto lapso.

Las pruebas de aglutinación se pueden probar en placa, en tubo y en microplaca de titulación, seleccionando el

procedimiento que más convenga en cuanto a tiempo e interpretación.

## CAPITULO 2.

## 2.1- DIAGRAMA DE FLUJO.

"DETERMINACION DE ANTICUERPOS EN LA ALVEOLITIS ALERGICA EXTRINSECA".

## 2.2.-DISEÑO EXPERIMENTAL.

A los tres diferentes grupos de individuos se les investigó la presencia de anticuerpos anti-ave por los siguientes métodos: precipitación en gel y en capilar, hemaglutinación indirecta, aglutinación con carbón activado y reacción en superficie. El primer grupo está constituido por pacientes diagnosticados previamente como positivos a la alveolitis alérgica extrínseca en una clínica del seguro social, el segundo, está formado de individuos sanos y de otros que diéron resultado positivo en pruebas cutáneas a alérgenos de plumas de aves y el tercero por pacientes con enfermedades pulmonares tales como asma bronquial, cáncer de pulmón y tuberculosis.

Para llevar a cabo la titulación de anticuerpos por la técnica de hemaglutinación indirecta, se utilizaron como reactivos glóbulos rojos humanos tipo O Rh negativo, los cuales fueron sensibilizados con suero de pollo por tres técnicas diferentes, para su comparación.

En el caso de la aglutinación con partículas de carbón activado, también se realizó el recubrimiento de este material con suero de pollo.

Todos los métodos de aglutinación se llevaron a cabo en placa, en tubo y en microplaca de titulación, además, en

aquellas determinaciones en tubo se utilizó el suero de Coombs para aumentar la sensibilidad.

En todas las pruebas se corrió como control positivo un suero anti-pollo producido en conejo.

Finalmente, los resultados fueron analizados comparandolos entre los de las técnicas de precipitación y las de aglutinación y reacción en superficie, para observar las diferencias existentes entre unos y otros.

### 2.3.- METODOS UTILIZADOS.

#### 2.3.1.- HEMAGLUTINACION INDIRECTA.

Se utilizan tres métodos de sensibilización de glóbulos rojos: con glutaraldehído, con cloruro crómico y la combinación de ambos (ver Apéndice 1).

#### 2.3.2.- AGLUTINACION CON CARBONO.

Se utilizó el carbón activado como único método con partículas inertes de origen no biológico. (ver Apéndice 1).

#### 2.3.3.- REACCION DE FIJACION EN SUPERFICIE.

Empleamos papel para cromatografía con poro pequeño para el atrapamiento de la red insoluble. Esta prueba fue leída únicamente como positivo o negativo. (ver Apéndice 1).

## CAPITULO 3.

RESULTADOS.

Es importante realizar tres diferentes grupos de pacientes cada uno con características diferentes:

El grupo 1, son los pacientes 1,6,19 y 22, los cuales habían sido diagnosticados previamente por el método de precipitación en capilar como positivos a la alveolitis alérgica extrínseca en una clínica.

El grupo 2, el cual va a estar compuesto por los pacientes del 2 al 5, del 7 al 18, el 20 y 21, del 23 al 26, unos de estos diéron positivo por medio de reacciones cutáneas tres cruces como alérgicos a plumas de aves, otros fuéron tomados al azar de pacientes que unicamente iban al Servicio de Alérgia del Hospital General para consulta ajena al tema.

El grupo 3, son los controles negativos para probar especificidad de la prueba, estos pacientes son del 28 al 32.

A cada paciente de los tres grupos se les realizáron las siguientes pruebas: Precipitación en capilar, en gel, reacción en superficie y aglutinación con carbón, glóbulos rojos (los tes diferentes reactivos).

Se obtuviéron estos resultados:

Del grupo 1, únicamente el 1 dió título positivo en las aglutinaciones y positivo en los tres otros métodos, tomando en cuenta que en la precipitación en gel dió positivo a las 48 horas, en cambio los otros tres pacientes fuéron negativos en

todas las pruebas.

Del grupo 2, los pacientes 2,7,23 y 24 fueron positivos, a excepción del 2, en todas las pruebas, el 2 únicamente dió título en las aglutinaciones.

El resto de los pacientes fueron negativos en todas las pruebas a excepción del 20 y 21 que no dieron título positivo en aglutinaciones y fueron positivos en ambas precipitaciones y en la reacción en superficie.

Del grupo 3, todos sin excepción fueron negativos en todas las pruebas.

PACIENTE	PRECIPITACION EN CAPILAR	PRECIPITACION EN GEL	REACCION EN SUPERFICIE
#1	+	+	POSITIVO
#2	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
#3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#4	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#5	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
#6	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#7	+	+	POSITIVO
#8	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#9	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

PACIENTE	PRECIPITACION EN CAPILAR	PRECIPITACION EN GEL	REACCION EN SUPERFICIE
#10	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#11	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#12	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO
#13	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#14	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#15	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#16	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#17	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#18	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO

PACIENTE	PRECIPITACION EN CAPILAR	PRECIPITACION EN GEL	REACCION EN SUPERFICIE
#19	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#20	+	+	POSITIVO
#21	++	++	POSITIVO
#22	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#23	+	+	POSITIVO
#24	++	++	POSITIVO
#25	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#26	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
#27	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO

PACIENTE	PRECIPITACION EN CAPILAR	PRECIPITACION EN GEL	REACCION EN SUPERFICIE
----------	-----------------------------	-------------------------	---------------------------

---

#28	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
-----	----------	----------	----------

#29	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
-----	----------	----------	----------

#30	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
-----	----------	----------	----------

#31	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
-----	----------	----------	----------

#32	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO.
-----	----------	----------	-----------

PACIENTES	GLOBULOS ROJOS GEUTARALDHEIDO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO + GLUTERALDHEIDO		CARBON SENSIBILIZADO	
	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs
#1 S/Inact.	1:80	1:100	1:60	1:80	1:120	1:160	1:320	1:640
Inact.	1:80	1:100	1:60	1:80	1:120	1:160	1:320	1:640
#2 S/Inact.	1:20	1:60	1:8	1:32	1:64	1:100	1:128	1:300
Inact.	1:20	1:60	1:8	1:32	1:64	1:100	1:128	1:300
#3 S/Inact.	1:2	1:4	1:2	1:4	1:3	1:5	1:4	1:8
Inact.	---	---	---	---	---	---	1:2	1:4
#4 S/Inact.	---	---	---	---	---	---	1:2	1:2
Inact.	---	---	---	---	---	---	1:2	1:2
#5 S/Inact.	1:10	1:16	1:8	1:16	1:16	1:30	1:16	1:40
Inact.	1:8	1:16	1:4	1:10	1:14	1:30	1:14	1:32
#6 S/Inact.	---	---	---	---	1:2	1:4	1:8	1:10
Inact.	---	---	---	---	1:2	1:4	1:8	1:10
#7 S/Inact.	1:80	1:140	1:80	1:160	1:100	1:160	1:160	1:320
Inact.	1:80	1:140	1:80	1:160	1:100	1:160	1:160	1:320

NOTA: La inactivación del suero de los pacientes se llevo a cabo a 56°C por media hora.

PACIENTES	GLOBULOS ROJOS GLUTARALDHEIDO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO + GLUTERALDHEIDO		CARBON SENSIBILIZADO	
	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs
#8	Sin Inact.	---	---	---	---	---	1:2	1:4
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---
#9	Sin Inact.	---	---	---	---	---	1:4	1:6
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---
#10	Sin Inact.	---	---	---	---	---	1:2	1:4
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---
#11	Sin Inact.	---	---	---	1:2	1:4	1:4	1:8
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---
#12	Sin Inact	1:10	1:16	1:8	1:16	1:16	1:32	1:30
	Inact	1:10	1:16	1:8	1:16	1:16	1:32	1:30
#13	Sin Inact	---	---	---	---	---	1:2	1:4
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---
#14	Sin Inact.	---	---	---	---	1:4	1:6	1:4
	Inact.	---	---	---	---	---	---	1:2

NOTA: La inactivación del suero de los pacientes se llevo a cabo a 56°C por media hora.

PACIENTES	GLOBULOS ROJOS GLUTARALDHEIDO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO + GLUTARALDHEIDO		CARBON SENSIBILIZADO		
	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	
#15	Sin Inact.	---	---	---	---	---	---	1:2	
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	
#16	Sin Inact.	---	---	---	---	---	1:2	1:4	
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	
#17	Sin Inact.	---	---	---	1:2	1:4	1:2	1:8	
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	
#18	Sin Inact.	1:2	1:4	---	1:3	1:8	1:4	1:16	
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	
#19	Sin Inact.	---	---	---	---	---	1:2	1:4	
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	
#20	Sin Inact.	1:4	1:8	1:2	1:3	1:10	1:16	1:32	1:64
	Inact.	1:4	1:8	1:2	1:2	1:10	1:16	1:32	1:64
#21	Sin Inact	1:8	1:16	1:4	1:8	1:32	1:64	1:128	1:256
	Inact	1:8	1:16	1:4	1:8	1:32	1:64	1:128	1:256

NOTA: La inactivación del suero de los pacientes se llevo a cabo a 56°C por media hora.

PACIENTES	GLOBULOS ROJOS GLUTARALDHEIDO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO		GLOBULOS ROJOS CLORURO CROMICO + GLUTERALDHEIDO		CARBON SENSIBILIZADO		
	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	s/Coombs	c/Coombs	
#22	Sin Inact.	---	---	---	---	---	1:2	1:4	
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	
#23	Sin Inact.	1:16	1:32	1:10	1:16	1:64	1:100	1:160	1:320
	Inact.	1:16	1:32	1:10	1:16	1:64	1:100	1:160	1:320
#24	Sin Inact.	1:16	1:32	1:16	1:30	1:128	1:256	1:320	1:640
	Inact.	1:16	1:32	1:16	1:30	1:128	1:256	1:320	1:640
#25	Sin Inact.	---	---	---	---	---	1:2	1:4	
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	
#26	Sin Inact.	1:2	1:4	---	---	1:2	1:8	1:4	1:8
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	1:2
#27	Sin Inact.	---	---	---	---	---	---	---	---
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	---
#28	Sin Inact.	---	---	---	---	---	---	---	---
	Inact.	---	---	---	---	---	---	---	---

NOTA: La inactivación del suero de los pacientes se llevo a cabo a 56°C por media hora.



### 3.2.-DISCUSION DE LOS RESULTADOS.

Se toman diferentes títulos diagnósticos en cada una de las aglutinaciones, ya que cada una posee diferente sensibilidad:

glóbulos rojos con glutaraldeido sin Coombs= 1:16.

glóbulos rojos con cloruro crómico sin Coombs= 1:8.

mezcla de ambos reactivos sin Coombs= 1:64.

carbón activado sin Coombs= 1:128.

Para las precipitaciones:

en gel: positivo cuando apareció una ligera banda a las 72 horas, una cruz cuando apareció a las 48 horas y dos cruces cuando apareció a las 24 horas.

en capilar: una cruz por cada milímetro de precipitado.

Para la reacción en superficie: únicamente positivo o negativo.

En el grupo 1, todas las pruebas de cada uno de los pacientes concuerdan siendo positivas para el 1 y negativas para el resto, el paciente 1 tiene un título alto de anticuerpos y es por esa razón que fueron fácilmente detectables.

En el grupo 2, los pacientes 7,23 y 24 concuerdan en todas las pruebas, el 24 dió positivo en gel a las 24 horas de

reaccionar, mientras que los otros dos a las 48 horas, el paciente 2, está en los límites bajos diagnósticos, por lo que es muy probable que si el tiempo de reacción en las precipitaciones hubiera sido mayor a las 72 entonces a lo mejor se verían bandas de precipitación; en cuanto a los sueros 20 y 21, que no fueron positivos en las aglutinaciones y si en las precipitaciones, probablemente se debió a errores en las manipulaciones, probablemente en las diluciones o en el manejo de los reactivos.

En el grupo 3, como se esperaba observar si los reactivos eran específicos, se utilizaron pacientes que tenían enfermedades en las vías respiratoria diferentes a la alveolitis alérgica extrínseca, ninguno fue positivo, aunque hay que tomar en cuenta que las personas que padecen cáncer pulmonar o tuberculosis están por lo general inmunodeprimidos.

A excepción de tres pacientes (2, 20 y 21), todas las pruebas concuerdan entre sí, pudiendo tener confianza en estas.

Es muy importante el observar que existe la posibilidad de que en el carbón activado exista una adsorción inespecífica y por esa razón estemos detectando títulos ínfimos como los de 1:2, por lo tanto es importante tomar como un título debido a esta adsorción hasta el de 1:8 y menor, a partir de 1:10, se puede tomar como una lectura de anticuerpos unidos a su antígeno.

## CAPITULO 4.

CONCLUSIONES.

- 1.-El método de precipitación en capilar es lo suficientemente sensible para detectar anticuerpos en este padecimiento, pero hay que tomar en cuenta que es el que más fácilmente cae en el fenómeno de zona.
- 2.-Los reactivos desarrollados en este trabajo y las técnicas de precipitación poseen la sensibilidad necesaria para diagnosticar este padecimiento.
- 3.-Dentro de los reactivos de aglutinación, el más sensible es el de carbón activado, el segundo el de la mezcla, el tercero el de glutaraldeído y finalmente el de cloruro crómico. El primero puede detectar títulos bastante bajos de anticuerpos y el cuarto muy altos.
- 4.-Las ventajas de los métodos desarrollados en este trabajo, son de que son cuantitativos y de una realización más rápida, ya que a las 18 horas se pueden leer los resultados.
- 5.-El método de reacción en superficie, también es más rápido pero tiene la desventaja de ser únicamente cualitativo.

6.-Es indispensable el uso del suero de Coombs para poder obtener un título correcto de los anticuerpos.

7.-El método de carbón activado puede contar con la desventaja de una adsorción inespecífica de anticuerpos por lo que un título de 1:8 o menor no tiene ningún valor.

8.-De las condiciones de fácil realización, sin equipo especial, de bajo costo y de rápida realización la de carbón activado las cumple satisfactoriamente.

9.-Los métodos enzimáticos y radiactivos, siguen siendo los más recomendables para un diagnóstico certero, y para la persona que tenga los recursos económicos para utilizarlos son los de utilizar, pero las personas de bajos recursos económicos, y en las clínicas rurales pueden utilizarse los de precipitación o los nuevos de aglutinación, dependiendo del caso.

RESUMEN.

Se plantea la problemática de contar para el diagnóstico de la alveolitis alérgica extrínseca con métodos poco sensibles y los más sensibles con un costo de realización inalcanzable para las instituciones públicas de salud.

Tomando en cuenta que el padecimiento es una reacción de Tipo III, que quiere decir, mediada por anticuerpos precipitantes y aglutinantes de clase IgG, se utiliza esta propiedad para desarrollar un método de aglutinación, tomando como soporte glóbulos rojos y carbón activado.

Después de correr todas las pruebas, anteriores y recién desarrolladas a un grupo de treinta y dos personas, se llega al resultado de que se lograron desarrollar métodos más rápidos y con un costo muy inferior a los más sensibles, que lo pueden utilizar las clínicas de salud pública y de que no requieren de un equipo especial.

APENDICE 1.

## 1.1.- MATERIAL.

## EQUIPO:

El equipo de rutina en el laboratorio de inmunología.

## MATERIALES:

Formol.

NaCl.

Sulfato de amonio.

Timerosal.

Glutaraldeido.

Azida de sodio.

Agarosa.

Cloruro de cromo.

Sales de fosfatos.

Carbón vegetal activado.

Sangre fresca de humano Tipo "O" Rh negativo.

Glicina.

Negro de Amidoschwartz.

Suero normal de conejo.

Suero de paloma.

Suero de pollo.

Albúmina bovina.

Acido acético.

Metanol.

Fenol.

1.2.- ANIMALES.

2 conejos jóvenes de 2.5 Kg. para la obtención de un suero de Coombs.

2 conejos jóvenes de 2.5 Kg. para la obtención de un suero positivo anti-pollo.

1 chivo joven de 20 Kg. para la obtención de un suero de Coombs anti-conejo.

### 1.3.- METODOS.

#### 1.3.1-- "PURIFICACION DE GAMMA GLOBULINA HUMANA".

1.- Se obtiene sangre fresca humana, no importando el tipo, se obtiene con o sin anticoagulante, lo cual no es importante para la purificación. Se centrifuga la sangre y se separa el suero o plasma de la porción celular.

2.- Se mide el volumen del suero o plasma y se le adiciona una cantidad igual de solución salina isotónica.

3.- Se coloca sobre un agitador magnético y se le va adicionando poco a poco un volumen igual al del suero o plasma de una solución saturada de sulfato de amonio.

Se va a ir observando poco a poco la aparición de un precipitado.

4.- Se deja reposar por 24 horas en refrigeración para obtener una buena sedimentación y la total formación del precipitado.

5.- Se centrifuga a alta velocidad y se elimina el sobrenadante. Al sedimento se le adicionan unas gotas de agua destilada para redissolver.

6.- Se pasa todo el resuspendido a una bolsa para diálisis y se dializa contra solución salina durante 5 días cambiando la solución salina cada 12 horas. El dializado se guarda en refrigeración para evitar una contaminación.

7.- Transcurrido el tiempo de diálisis, se pasa a un frasco con

tapón el cual debe permanecer en refrigeración hasta ser utilizado.

### 1.3.2.- "OBTENCION DEL SUERO DE COOMBS".

1.- Se utilizan dos conejos jóvenes de 2.5 Kg cada uno para su inmunización.

2.- A cada uno de los conejos se les inyecta gamma globulina humana purificada siguiendo un esquema de inmunización como se detalla a continuación:

DIA 1 : Se preparó una solución de gamma globulina humana purificada con adyuvante completo de Freund, y se le inyectó a cada conejo 1 ml de esta solución por vía sub-cutánea.

DIA 8 : Se preparó la misma solución anterior y se le inyectó la misma cantidad de antígeno por vía sub-cutánea.

DIA 15: Se preparó una solución de gamma globulina humana purificada con adyuvante incompleto de Freund y se le inyectó por vía intramuscular 0.5 ml.

DIA 22: Se hizo una sangría de prueba y se tituló el suero del conejo contra gamma globulina humana por precipitación en gel.

DIA 30: Se le inyectó por vía venosa 0.1 ml de gamma globulina humana purificada diluida 1:10.

DIA 40: Se le practicó otra sangría de prueba y se tituló el suero del conejo contra glóbulos rojos sensibilizados con gamma glóbulina humana.

DIA 45: Se le inyectó por vía venosa 0.1 ml de gamma globulina concentrada.

DIA 70. Se le practicó una sangría de prueba y se tituló contra glóbulos rojos sensibilizados con gamma globulina humana.

DIA 80. Se practicó una sangría total del conejo por punción cardíaca.

3.- El suero obtenido se repartió en frascos y se les adicionó 0.001g de azida sodio como conservador.

### 1.3.3. "OBTENCIÓN DE UN SUERO POSITIVO ANTI-POLLO EN CONEJO".

1.- La sangre se obtuvo del rastro de pollos, sin anticoagulante para así obtener el suero.

2.- Se utilizaron dos conejos jóvenes de 2.5 Kg cada uno para su inmunización.

3.- A cada uno de los conejos se les inyectó suero puro de pollo siguiendo un esquema de inmunización como se detalla a continuación.

DIA 1 : Se preparó una solución de suero de pollo con adyuvante completo de Freund, y se le inyectó al conejo 1 ml de esta solución por vía subcutánea.

DIA 8 : Se preparó la misma solución anterior y se le inyectó la misma cantidad de antígeno por vía sub-cutánea.

DIA 15 : Se preparó una solución de suero de pollo con adyuvante incompleto de Freund y se le inyectó por vía intramuscular 0.5 ml.

DIA 22 : Se hizo una sangría de prueba y se tituló el suero del conejo contra suero de pollo por precipitación en gel por no contar todavía con glóbulos rojos sensibilizados.

DIA 30 : Se le inyectó por vía venosa 0.1 ml de suero de pollo diluido 1:10.

DIA 40 : Se le practicó otra sangría de prueba y se tituló el suero del conejo contra glóbulos rojos sensibilizados con suero de pollo.

DIA 45 : Se le inyectó por vía venosa 0.1 ml de suero de pollo

diluido 1:10.

DIA 60 : Se le inyectó por via venosa 0.1 ml de suero de pollo concentrado.

DIA 70 :Se le practicó una sangria de prueba y se tituló contra glóbulos rojos sensibilizados con suero de pollo purificado.

DIA 80 : Se practicó una sangria total del conejo por punción cardiaca.

4.- El suero obtenido se repartió en frascos y se les adicionó 0.001g. de azida de sodio como conservador.

#### 1.3.4.- "OBTENCION DE UN SUERO DE COOMBS ANTI-CONEJO".

1.- Se obtuvo gamma globulina purificada de conejo siguiendo el mismo método que para la gamma globulina humana.

2.- Se utilizó un chivo joven de 20 Kg para su inmunización.

3.- Se siguió un esquema de inmunización con gamma globulina purificada de conejo como a continuación se detalla:

DIA 1 : Se preparó una solución de 2 ml de adyuvante completo de Freund más 1 ml de gamma globulina de conejo pura y se le inyectaron los 3 ml por vía sub-cutánea formando seis puntos de inoculación.

DIA 10 : Se realizó una sangría de prueba titulándose el suero del chivo contra gamma globulina de conejo pura por precipitación en gel.

DIA 10 : Se preparó una solución de 2 ml de adyuvante incompleto de Freund más 1 ml de gamma globulina de conejo pura, se le inyectaron los 3 ml de la solución por vía sub-cutánea formando 6 puntos de inoculación.

DIA 20 : Se realizó una sangría de prueba titulándose el suero del chivo contra gamma globulina de conejo pura por precipitación en gel.

DIA 20 : Se le inyectó por vía muscular 1 ml de gamma globulina de conejo pura.

DIA 30: Se le inyectó por vía intramuscular 1 ml de gamma globulina de conejo pura.

DIA 40 :Se le practicò una sangria de prueba titulándose el suero de chivo contra gamma globulina de conejo pura por precipitación en gel.

DIA 40 : Se le administrò por via intravenosa suero completo de conejo.

DIA 50 : Se le practicò una sangria obteniéndose 200 ml de sangre sin anticoagulante.

4.- Se preparò el suero de la porción celular de la sangre y se separò el suero en frascos adicionándole 0.001gde azida de sodio como conservador.

5.- Se titulò el suero del chivo contra gamma globulina y contra suero total de conejo por precipitación en gel.

### 1.3.5.- "FORMALINIZACION DE GLOBULOS ROJOS".

1.- Se recolectan glóbulos rojos humanos Tipo "0", en una solución de ácido cítrico-dextrosa, se lavan cinco veces con solución salina isotónica.

2.- Es importante al realizar el último lavado, observar que no exista hemólisis, en el caso de haber, se repite el lavado.

3.- Se colocan en un recipiente de 500ml, conteniendo 200ml de solución salina isotónica, un paquete celular de 50ml.

4.- Al recipiente se le adicionan 50ml de formalina comercial, lentamente y con agitación constante, terminada la operación, se guardan en refrigeración toda la noche.

5.- Al día siguiente, es necesario lavar el paquete celular con solución salina y repetir el paso 4.

6.- Repetir la operación al día siguiente.

7.- Se pueden conservar en este estado los glóbulos rojos hasta el momento de ser utilizados, para poder usarlos, es necesario efectuar un lavado muy efectivo con solución salina hasta eliminar completamente toda la formalina.

### 1.3.6.- "SENSIBILIZACION DE GLOBULOS ROJOS".

#### 1.3.6.1.-METODO CON CLORURO CROMICO:

##### MATERIAL:

Antígeno protéico (suero de pollo o de paloma).

Solución de cloruro crómico al 1% disuelto en NaCl 0.15 M.

Soluciones 0.11M y 0.15M de NaCl.

##### METODO:

1.- Se hace un lavado previo de los eritrocitos utilizando solución salina 0.15 M, centrifugando a 1000 RPM y eliminando el sobrenadante, éste procedimiento se repite tres veces.

2.- Se agrega un volumen de solución de cloruro de cromo a un volumen de antígeno en solución salina 0.15 M.

3.- Se adiciona inmediatamente un volumen de glóbulos rojos al 10% en solución salina (los glóbulos rojos formolizados), se mezcla bien y se deja reposar a temperatura ambiente por cuatro minutos.

4.- Los glóbulos rojos al 10% se lavan en la solución 0.15 M de cloruro de sodio adicionando 2% de albumina bovina, para tener un medio protéico y así conservarlos mejor y por más tiempo.

5.- Esta técnica de diagnóstico se puede realizar en placa de vidrio, en microplaca de titulación y por diluciones seriadas en tubo.

6.- La lectura es macroscópica por lo que no requiere de equipo

especializado.

Nota: Para las técnicas de aglutinación observar apéndice 2.

#### 1.3.6.2.- "METODO CON GLUTARADHEIDO".

##### MATERIAL:

Antígeno protéico (suero de pollo o de paloma)

Solución acuosa de glutaraldeido al 2.5%.

Amortiguador de fosfatos 0.15 M pH 7.2.

##### METODO:

1.- Se lavan los glóbulos rojos con solución salina 0.15 M centrifugando a 1000 RPM por 5 minutos, se elimina el sobrenadante y se repite la operación tres veces.

2.- Se adicionan 0.4 ml de paquete celular lavado a 10 ml de Amortiguador de fosfatos 0.15 M conteniendo de 10-20 mg de proteínas del suero de pollo, tomando en cuenta que cada 100ml de suero contiene 7.5g de proteínas totales .

3.- Se agita suavemente la suspensión por 20 minutos a temperatura ambiente.

4.- Se añaden de 0.5 - 2.0 ml de la solución de glutaraldeido al 2.5%.

5.- Se continúa la agitación por una hora a temperatura ambiente.

6.- Se lavan los glóbulos rojos sensibilizados tres veces en la solución salina 0.15 M y se resuspenden en la solución de PBS conteniendo 1% de suero normal de conejo con el fin de una buena y prolongada conservación reactivo.

7.- Esta técnica diagnóstica se puede realizar en placa, en tubo por diluciones seriadas y en microplaca de titulación.

8.- La lectura es macroscópica por lo que no requiere de equipo especializado.

Nota: Para las técnicas de aglutinación observar apéndice 2.

### 1.3.6.3.- "METODO CON GLUTARALDHEIDO + CLORURO CROMICO".

#### MATERIAL:

Antígeno protéico (suero de pollo o de paloma)-

Solución de cloruro crómico al 1% disuelto de NaCl 0.15M.

Soluciones 0.11M y 0.15M de NaCl.

Solución acuosa de glutaraldeído al 2.5%.

Amortiguador de fosfatos 0.15M pH 7.2.

Amortiguador de fosfatos salino 0.15M (PBS).

#### METODO:

1.- Se sensibilizan glóbulos rojos con el antígeno protéico por el mismo método del cloruro crómico.

2.- Después de los lavados de los glóbulos rojos sensibilizados, se continúa con la técnica del glutaraldeído con las mismas proporciones descritas en el método.

3.- Una vez lavados los glóbulos rojos se resuspenden en Amortiguador de fosfatos 0.15M para mantenerlos a un pH ideal y así evitar que se despegue el antígeno.

4.- Esta técnica diagnóstica se puede realizar en placa, en tubo por diluciones seriadas o en microplaca de titulación.

5.- La lectura de los resultados es macroscópica por lo que no requiere de equipo especializado.

Nota: Para las técnicas de aglutinación observar apéndice 2.

### 1.3.7.- "AGLUTINACION CON CARBON".

#### MATERIALES:

Carbón activado vegetal finamente molido.

Antígeno protéico (suero de pollo o de paloma), clarificado por centrifugación a alta velocidad.

Amortiguador de fosfatos pH 7.2 0.15M.

#### METODO:

1.- Se suspende el carbón activado en el amortiguador de fosfatos y se le adiciona gota a gota 0.4 ml de suero diluido 1:10, todo esto con agitación constante y a temperatura ambiente.

2.- Se continúa con esta agitación constante por media hora sin variar la temperatura.

3.- Se centrifuga a 3500 RPM durante cinco minutos y se elimina el sobrante.

4.- El sedimento se resuspende en el amortiguador de fosfatos 0.15 M hasta obtener la concentración deseada en donde la aglutinación que se observa es franca y gruesa.

5.- Esta técnica diagnóstica se puede realizar en placa de vidrio de color blanca, en tubo por diluciones seriadas o en microplaca de titulación.

6.- La lectura de los resultados es macroscópica por lo que no requiere de equipo especializado.

Nota: Para las técnicas de aglutinación, observar apéndice 2.

### 1.3.8.- "PRECIPITACION EN GEL".

#### MATERIAL:

Amortiguador de fosfatos 0.15M pH 7.2.

Portaobjetos.

#### METODO:

- 1.- Se desengrasan perfectamente los portaobjetos con alcohol y jabón, secándolos con papel.
- 2.- Se prepara una solución al 0.1% de agarosa en agua peso por volumen, se calienta la solución hasta la completa disolución de la agarosa.
- 3.- Se barnizan los portaobjetos con esta solución por los dos lados y se dejan secar.
- 4.- Se prepara una solución de agarosa al 1% en amortiguador de fosfatos y se calienta hasta la completa disolución de la agarosa.
- 5.- Se cubren los portaobjetos barnizados con la nueva solución de agarosa hasta quedar completamente cubiertos.
- 6.- Se dejan solidificar completamente a temperatura ambiente y una vez secos se le practican cinco horadaciones en el gel, una en el centro y cuatro periféricas equidistantes.
- 7.- Se coloca el antígeno en el centro y en cada una de los cuatro orificios de alrededor se pone: un suero positivo y tres

sueros de pacientes.

8.- Los sueros y el antígeno se dejan difundir a temperatura ambiente en una cámara húmeda y se leen los resultados a las 24,48 y 72 horas.

### 1.3.9.- "PRECIPITACION EN CAPILAR".

#### MATERIAL:

Antígeno protéico (suero de pollo o de paloma).

Tubos capilares.

#### METODO:

- 1.- Se toma una cantidad igual de antígeno que de suero problema con un tubo capilar.
- 2.- Se agita bien con la mano.
- 3.- Se coloca el tubo sobre una superficie con plastilina y se deja reaccionar en posición vertical.
- 4.- Se leen los resultados a las 24,48 y 72 horas.

### 1.3.10.- "REACCION DE FIJACION EN SUPERFICIE".

#### MATERIAL.

Papel filtro Watmann núm. 1.

Colorante para proteínas negro de Amido shwartz.

Solución de ácido acético, fenol y metanol.

#### METODO:

- 1.- Se diluyen los sueros problema, el control positivo y el control negativo y el antígeno 1:10 en solución salina isotónica.
- 2.- Se colocan 0.1 ml de antígeno en un tubo de ensayo y se adiciona 0.1 ml. del suero problema en el mismo tubo y se deja reaccionar por 24 horas a 4 C. Se hace el mismo procedimiento con los controles positivo y negativo.
- 3.- Se corta el papel filtro en forma cuadrada teniendo 5 cm. por lado.
- 4.- Después del tiempo de reacción, se colocan en el papel filtro: una gota del control positivo, una gota del control negativo y una gota del suero problema.
- 5.- Se introduce el papel filtro en una cámara de cromatografía utilizando como eluyente solución salina isotónica y se deja eluir hasta el borde superior del papel filtro.

6.- Se tiñe el papel filtro en el colorante para proteínas durante tres minutos.

7.- Se lava el papel filtro en la solución de ácido acético, fenol y metanol varias veces.

8.- Se deja secar a temperatura ambiente.

9.- En el control positivo debe observarse una mancha azul, en el control negativo una mancha blanca.

APENDICE 2.

## 2.1.- "TECNICAS DE AGLUTINACION".

## 2.1.1.- AGLUTINACION EN PLACA.

1.- Sobre una placa lisa incolora en el caso de glóbulos rojos y blanca en el caso de carbón , se coloca una gota de solución salina como control negativo, una gota de suero positivo de conejo y una gota del suero del paciente, a cada una se le agrega una gota del reactivo preparado previamente (glóbulos rojos o carbón ) y se mezcla utilizando un aplicador de madera.

2.- Se agita suavemente por un lapso de 5 minutos y se observa la aglutinación en caso positivo y una suspensión sin grumos en caso negativo.

### 2.1.2.- "AGLUTINACION EN TUBO".

1.- Se coloca un tubo para control del antígeno con 0.5 ml de solución salina isotónica y se le adicionan 0.5 ml del antígeno, ya sean glóbulos rojos o carbón activado, y se le deja reaccionar a las mismas condiciones y el mismo tiempo que el resto de los tubos.

2.- En otro tubo, se adicionan 0.5 ml de solución salina isotónica, más 0.05 ml de suero normal de conejo y 0.5 ml. del antígeno, ya sea carbón activado o glóbulos rojos. Este tubo es empleado como control negativo.

3.- Se colocan 9 tubos en los cuales se les practican diluciones seriadas 1:10; 1:20; 1:40; 1:80; 1:160; 1:320; 1:640; 1:1280; 1:2560 del suero problema, utilizando como diluyente solución salina isotónica.

4.- Todos los tubos se dejan reaccionar por una hora a 37 C, después de transcurrido ese tiempo se ponen a reaccionar a temperatura ambiente por un tiempo promedio de 18-24 horas.

5.- Transcurrido el tiempo de reacción se observan los fondos de los tubos, un botón en el fondo indica un resultado negativo un anillo alrededor del fondo del tubo indica una reacción positiva.



2.1.3.-

"UTILIZACION DEL SUERO DE COOMBS PARA AGLUTINACION EN TUBO"

- 1.- Se sigue todo el procedimiento descrito anteriormente en la técnica de aglutinación en tubo.
- 2.- Al llegar al final de la técnica, se anotan los resultados y los tubos son centrifugados a 500 RPM durante 5 minutos, se elimina el sobrenadante.
- 3.- Se resuspende el sedimento en 1 ml de solución salina isotónica y se centrifuga a 500 RPM durante 5 minutos, este procedimiento se repite tres veces con el objeto de eliminar la gamma globulina que no reaccionó contenida en el suero problema.
- 4.- A cada tubo se le adicionan 0.1 ml de suero de Coombs y se dejan reaccionar por una hora a 37 C.
- 5.- Una vez transcurrido el tiempo de reacción, se agita suavemente el tubo y se coloca la gota contenida en el tubo sobre una placa, se mezcla bien y se esparce con la ayuda de un mondadientes y se agita suavemente por espacio de 5 minutos, al término de este tiempo, se observan los resultados, positivo es donde hubo una aglutinación franca y negativa es donde no se observan ningún grumo indicativo de aglutinación.
- 6.- Se observa la diferencia entre los resultados obtenidos antes de la utilización del suero de Coombs y los obtenidos después, la diferencia entre ambos nos es indicativa de la

concentración de anticuerpos incompletos.

2.1.4.- "AGLUTINACION EN MICROPLACA DE TITULACION".

1.- Se colocan en una microplaca de aglutinación con fondo redondo 25 microlitros de solución salina isotónica.

2.- Con la ayuda de un microdulotor se colocan 25 microlitros en el primer pozo y de ahí se siguen diluciones seriadas del suero problema empezando por la dilución de 1:2 hasta la dilución de 1:2048.

3.- El primer pozo se utiliza como control del antígeno y el segundo pozo se utiliza como control negativo con la ayuda de un suero normal de conejo.

4.- A cada uno de los pozos se les adiciona 25 microlitros de antígeno, ya sean glóbulos rojos o carbón activado.

5.- Se mezcla bien y se deja reaccionar a 37 C por espacio de media hora, transcurrido éste lapso se pone a reaccionar de 18-24 horas a temperatura ambiente.

6.- Finalmente observan los resultados, tomando como negativo un punto en el fondo del pozo y como positivo un anillo o masa difusa en el fondo del pozo.

## REFERENCIAS.

- 1.-Morgan, W.K.C. "Extrinsic Allergic Alveolitis".  
Annals of Allergy. 1974.  
33:155.
- 2.-Patterson, Roy. "Allergic Disease Diagnosis  
and Management". J.B. Lippid  
Company. 1972. 532.
- 3.-McCombs P. Robert. "disease due to Immunologic  
Reactions in Lungs".  
Enc. J. Med. 1972. 286:1246.
- 4.-Reed E. Charles. "pigeon Breeder's Lungs. A  
newly observed interstitial  
pulmonary disease". JAMA. 1965  
193:261.
- 5.-Pepys, J. "Hypersensitivity disease of  
the lungs due to fungi and  
organic dusts". S. Karker.  
New York. 1969.
- 6.-Ramazzini Bernardini. "Extrinsic allergic  
pneumoniasis". The American  
Journal of Medicine. 1972.  
53:131.
- 7.-Seal, E.M. "The pathology of the acute and  
chronic stages of farmer's lung".  
Hapke, J.E.

- Thorax. 1969. 23:469.
- 8.-Seal, E.M. "Farmers lung". Thorax. 1968.  
Hapke, J.E. 23:451.
- 9.-Turner, W.M. "Provoking factors in ashma".  
Brit. J. Dis. Chest. 1971.  
67:1.
- 10.-Pozzan M. "Alveoloiti allergiche". Folia  
Allergologica. 1973. XX No.2.
- 11.-Fink, N.J. "Pigeon breeder's disease".  
Sosman, J.A. Annals of Internal Medicine.  
1968. 68:1205.
- 12.-Fink, N.J. "Immunologic studies of pigeon  
Isman, J.A. breeder's diseases". J.Allerg.  
1967. 39:214.
- 13.-Faux, A.J. "Specificity of avain serum  
proteins in test against the  
sera of birdfanciers". Clinical  
Allergy. 1971. 1:149.
- 14.-Pepys, J. "Precipitin F.L.H. test in  
Jenkins, A.P. farmer's lung". Thorax. 1965.  
20:21.
- 15.-Edwarda, H.J. "Antigens in pigeon breeder's  
Barboriak, J.J. disease". Immunology. 1970.  
19:729.
- 16.-Barboriak, J.J. "Antigens specificity in  
Fink, N.J. hipersensibility". Int. Arch.

- Allergy. 1968. 33:473.
- 17.-Hargrave, E.F. "Bird breeder's". The Lancet. 1966. 1:444.
- 18.-Dinda, P.I. "Pulmonary finction studies in breeder's lung". Thorax. 1969 24:374.
- 19.-Hensley, G.T. "Lung biopsies of pigeon  
Garancis, J.C. breeder's diseases". Arch.Path. 1969. 87:572.
- 20.-Epstein, L.W. "Granolumatouhypersensibility"  
Prog. Allergy. 1967. 11:36.
- 21.-Edward, E. "Hypersensibility pneumonitis  
Walter, H. due to contamination of an air  
conditioner". N. Eng. J. Med. 1970. 283:271.
- 22.-Fink, J.N. Med. Clin. North Am. 58:157.  
1974.
- 23.-Pepys, J. Monogr. Allergy. Vol. 4, 1969.
- 24.-Roberto Barrios. "Enfermedades del tejido  
Rocio Chapela. conjuntivo y sus manifestaciones  
pulmonares".
- 25.-Roberto Barrios. "Subpopulation of the T cells  
Chapela, R. in lung biopsies from patients  
López, Sullivan. with pigeon breeder's disease".  
Lung. 1987. 165:181.
- 26.-Chapela, R. "Heterogeneidad en la historia

- Selman, M. natural de la alveolitis alérgica extrínseca". Neumol. Cir. Tórax, Mèx. Vol. 43. 1982.
- 27.-Chapela, R. Selman, M. "Neumonitis por hipersensibilidad. Deficiencia de la función T supresora en pacientes con neumonitis inducida por antígeno aviario". Arch. Invest. Med. Mèx 1985. 16:349.
- 28.-Chapela, R. Selman, M. "Biopsia pulmonar transpleural por toracoscopia en el diagnóstico de la neumopatía intersticial difusa". INER. Mèx. 1986. Vol. 22. 5:215.
- 29.-Semenzato, G. Agostini, C. "Lung T cells in hypersensitivity pneumonitis: Phenotypic and functional analyses". Am. J. Resp. Cell. Immun. 1986. Vol. 137:1164.
- 30.-Roitt, I. Brostoff, J. "Immunology", 2a edición. Gower medical publishing. London, 1985.
- 31.-Kawai, T. Salvaggio, J. "Precipitating Antibodies Against Organic Dust Antigens in Human Sera". Chest 64(4):420-426, 1973.
- 32.-Gell, PG. "Clinical Aspects of

- Coombs, RR. "Immunology". 2a edició. Philadelphia, FA Davis Co, 1968.
- 33.-Francois, J. "Inmunologia". 1a edició, Editorial LIMUSA, 678-680. 1984.
- 34.-Acroyd, JF. "Immunological Methods". Oxford, Blackwell Sci. Publications, 1964.
- 35.-Thomson, R. "Techniques in Clinical Immunology", Oxford, Blackwell Sci. Publications, 43-53, 1977.
- 36.-Mollison, PL. "Blood Transfusion in Clinical Medicine", 5th Edition, Oxford, Blackwell Sci. Publications. 1972.