



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**COMPENDIO DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS  
APLICADAS EN VIROLOGÍA**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

**PRESENTA:**

**NERINA MORALES RODRÍGUEZ**

**ASESORA:**

**M EN C. ANA LAURA VÁZQUEZ MARTÍNEZ**

**COASESORA:**

**M EN C. MARÍA LUCERO PANIAGUA GARCÍA**

**CUAUTITLÁN IZCALLI, ESTADO DE MÉXICO 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTTLÁN  
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

U.N.A.M.  
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
CUAUTTLÁN  
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES  
ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ  
DIRECTOR DE LA FES CUAUTTLÁN  
PRESENTE

ATN: M. EN A. ISMAEL HERNÁNDEZ MAURICIO  
Jefe del Departamento de Exámenes Profesionales  
de la FES Cuauttlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicarle a usted que revisa el Trabajo de Tesis

Compendio de pruebas diagnósticas aplicadas en Virología

Que presenta la presente: Narina Morales Rodríguez

Con número de cuenta: 302235591 para colomar el Título de la carrera Química Farmacéutica Biológica

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgar el mismo **VOTO APROBATORIO**.

ATENTAMENTE

'POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU'

Cuattlán Izcalli, Méx. a 19 de Febrero de 2015.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	Dra. Susana Eliza Mendoza Elvín	
VOCAL	Dr. Victor Manuel Zendejas Britón	
SECRETARIO	M. en C. Ana Laura Vázquez Martínez	
1er. SUPLENTE	M. en C. Alberto Nahuel Soto Guevara	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Raquel María de Refugio Tapia Romero	

NOTA: Los resultados se publican en el Boletín de Exámenes Profesionales (Boletín 127)

U.N.A.M.

## **AGRADECIMIENTOS.**

### **A mi súper papi**

Porque sin ti no estaría aquí, gracias por cuidarme siempre, por estar a mi lado tanto en las buenas como en las malas y ayudarme a levantarme en cualquier momento, eres y siempre serás mi gran ejemplo y mi adoración.

### **A mi hermanito**

Por ser mí amigo, mi hombro, en ocasiones mi cómplice y estar siempre conmigo, TQM Pit.

### **A mis geniales sobrinos (Val y Peri)**

Porque iluminaron mi vida desde que llegaron, me dan gran alegría y me presionaron para que terminara "los amo".

### **A Jesús Eduardo Salinas Fuentes**

Porque el tiempo que estuviste a mí lado fue lo mejor, por todos los geniales momentos que tuvimos, por siempre procurarme, soportarme y amarme; estuviste en la mayor parte de todo este proceso ayudándome y apoyándome y aunque no estés en el final se lo feliz y orgulloso que estarías, gracias por haber sido parte de mi vida. T. A. Eddy (mi ángel de la guarda).

### **A Dios**

Por la lindísima familia que me dio (incluyendo a todos los que quiero como si lo fueran), por los muy buenos amigos con los que cuento (en especial a mi "As" complementario) y por haber cruzado en mi camino a todas esas personas de las cuales he aprendido tanto en el aspecto profesional como en el personal.

### **A mi asesora de tesis Ana Laura Vázquez Martínez**

Por toda su ayuda incluyendo en la realización de este trabajo y porque gracias a sus enseñanzas adquirí el gran gusto por la virología.

### **A la UNAM**

Simplemente porque soy orgullosamente UNAM.

1.	INTRODUCCIÓN.....	1
2.	CULTIVOS CELULARES.....	3
3.	HUEVOS EMBRIONADOS.....	19
4.	ANIMALES DE LABORATORIO.....	29
4.1	CLASIFICACIÓN DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO	
4.1.1	CLASIFICACIÓN POR EL GRADO DE PARENTESCO	
4.1.2	CLASIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA	
4.2	ANIMALES USADOS EN LA EXPERIMENTACIÓN	
4.2.1	RATONES	
4.2.2	RATAS	
4.2.3	PRIMATES NO HUMANOS	
4.2.4	AVES	
4.2.5	MOSQUITOS	
4.2.6	EQUINOS Y CAPRINOS	
5.	PRUEBAS SEROLÓGICAS.....	37
5.1	FIJACIÓN DE COMPLEMENTO (FC)	
5.2	AGLUTINACIÓN	
5.2.1	HEMAGLUTINACIÓN VIRAL (HA)	
5.2.2	INHIBICIÓN DE LA AGLUTINACIÓN (IH)	
5.3	NEUTRALIZACIÓN VIRAL	
5.4	RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)	
5.5	INMUNOFLUORESCENCIA (IF) Y CLASIFICACION DE CELULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA (FACS)	

5.6	ELISA Y WESTERNBLOT (WB)	
5.7	QUIMIOLUMINISCENCIA (QL)	
6.	PRUEBAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR.....	61
6.1	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)	
6.2	POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP)	
6.3	HIBRIDACIÓN (NORTHERN BLOT Y SOUTHERN BLOT)	
6.4	SECUENCIACIÓN	
6.5	FISH Y MICROARREGLOS	
7.	APÉNDICES.....	78
7.1	APÉNDICE I. Ventajas y desventajas de las pruebas diagnósticas aplicadas en virología.	
7.2	APÉNDICE II. Bioseguridad en el laboratorio.	
7.3	APÉNDICE III. Control de calidad en el laboratorio.	

## OBJETIVO GENERAL

Realizar un material didáctico y de apoyo en este caso un compendio de virología, por medio de investigación bibliográfica para facilitar la comprensión de conceptos básicos así como las diversas técnicas de identificación de virus utilizadas en la práctica de enseñanza o campo laboral de esta materia.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar y seleccionar la información bibliohemerográfica relevante y actualizada que permita conjuntar el material de apoyo adecuado a las necesidades de un curso de licenciatura.
- Conocer los materiales (animales, reactivos, instalaciones equipos, entre otros) y técnicas utilizadas mediante una explicación teórica acerca de la constitución de cada una de estas.
- Dar a conocer el fundamento de cada una de las pruebas de laboratorio, mediante el desarrollo del procedimiento práctico de las pruebas de laboratorio.
- Ordenar y esquematizar el compendio de acuerdo a los diferentes métodos para que pueda ser utilizada como un documento de referencia para estudiantes, docentes y profesionales de la salud.

## ABREVIATURAS Y SIGLAS.

<b>Ac</b>	Anticuerpo	<b>HEPES</b>	Ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico
<b>ADV</b>	Adenovirus	<b>HSV</b>	Virus herpes simple
<b>Ag</b>	Antígeno	<b>IF</b>	Inmunofluorescencia
<b>ANA</b>	Anticuerpos antinucleares	<b>Ig</b>	Inmunoglobulina
<b>ATP</b>	Adenosin trifosfato	<b>IHA</b>	Inhibición de la hemaglutinación
<b>BPS</b>	Buffer fosfato salino	<b>LCM</b>	Virus de la coriomeningitis linfocitaria
<b>CMV</b>	Citomegalovirus	<b>LES</b>	Lupus Eritematoso Sistémico
<b>dNTP</b>	Desoxinucleótido	<b>MSV</b>	Virus del Sarcoma Murino
<b>ddATP</b>	Didesoxinucleótido trifosfato adenina	<b>QL</b>	Quimioluminiscencia
<b>ddCTP</b>	Didesoxinucleótido trifosfato citosina	<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>ddGTP</b>	Didesoxinucleótido trifosfato guanina	<b>RFLP</b>	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>ddNTP</b>	Didesoxinucleótido	<b>RIA</b>	Radioinmunoanálisis
<b>ddTTP</b>	Didesoxinucleótido trifosfato timina	<b>SARS</b>	Síndrome respiratorio agudo severo
<b>ELISA</b>	Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas	<b>SPF</b>	Libe de gérmenes patógenos específicos
<b>EP</b>	Embrión de pollo	<b>TES</b>	Ácido N-ttris-(hidroximetil)metil-2-aminometanosulfónico
<b>FAb</b>	Fragmento de unión	<b>TRITC</b>	Isotiocianato ditetrametilrodamina
<b>FACS</b>	Clasificación de células activadas por fluorescencia	<b>VEB</b>	Virus Epstein-Barr
<b>FC</b>	Fijación del complemento	<b>VHB</b>	Virus Hepatitis B
<b>Fc</b>	Fragmento cristizable	<b>VHC</b>	Virus Hepatitis C
<b>FISH</b>	Hibridación Fluorescente in situ	<b>VIH</b>	Virus de inmunodeficiencia humana
<b>FITC</b>	Isotiocianato de fluoresceína	<b>VNi</b>	Virus de Nipah
<b>FIV</b>	Virus de inmunodeficiencia felina	<b>VPH</b>	Virus Papiloma Humano
<b>GF</b>	Libe de gérmenes	<b>VRS</b>	Virus respiratorio sincicial
<b>HA</b>	Hemaglutinación	<b>WB</b>	Western blot

# 1. INTRODUCCIÓN

La virología es un tema interesante que se encuentra en rápido y constante desarrollo, es de gran importancia para los seres humanos debido a que todo el tiempo los virus son amenazas para su salud, por lo que requiere de tiempo y dedicación para su estudio.

Los virus son parásitos intracelulares obligados y submicroscópicos con las siguientes características:

- Las partículas víricas se producen mediante el ensamblaje de componentes preformados, mientras que otros agentes crecen por un aumento de la suma de sus componentes y se reproducen por división.
- Las partículas víricas (viriones) no crecen ni sufren división.
- Los virus carecen de información genética que codifique estructuras necesarias para la generación de energía metabólica o para la síntesis de proteínas (ribosomas).<sup>(1)</sup>

Debido a la dificultad para observarlos y a su condición de parásitos intracelulares obligados, se han tenido que implementar pruebas para demostrar su presencia.

Al igual que la mayoría de los microorganismos, los virus se pueden descubrir ya sea de una forma directa o indirecta:

- 1) Métodos directos: Las pruebas directas son las que evidencian al virus o algunos de los antígenos virales que se pueden encontrar presentes en los tejidos o fluidos humanos.

1.1 Cultivo, aislamiento e identificación en:

- Animales de experimentación.
- Embrión de pollo.
- Cultivos celulares.

1.2 Demostración de virus en una muestra y su identificación.

- Microscopía electrónica.
- Técnicas inmunológicas de detección de antígeno (ELISA, IF directa, RIA).
- Detección e identificación de ácidos nucleicos y proteínas virales (PCR, hibridación).

- 2) Métodos indirectos: Técnicas inmunológicas. Estas son las técnicas serológicas tradicionales para descubrir anticuerpos contra determinado agente viral, teniendo en cuenta que la exposición al agente produce una respuesta por parte del sistema inmune que genera la producción de anticuerpos específicos.

2.1 Cuantificación de la reacción antígeno- anticuerpo.

- Fijación de complemento.
- Aglutinación.
- Neutralización viral.
- Inhibición de la hemaglutinación.
- IF indirecta.

- Western blot.
- ELISA.
- RIA. <sup>(2)</sup>

La tecnología de la Biología molecular ha revolucionado la virología y, en gran medida, ha desplazado el foco de atención de la partícula vírica al genoma vírico. Esta tecnología centrada en los ácidos nucleicos, además de sus últimos logros de secuenciación genómica y manipulación artificial de los genomas virales, también ofreció avances significativos en la detección de virus e infecciones víricas mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos.<sup>(1)</sup>

### Referencias

1. Cann, Alan J. (2005). Principios de virología molecular. Zaragoza, España: Editorial Acribia, p.2.
2. Crespo, María del Pilar (2000). El diagnóstico viral por el laboratorio. En Colombia Médica. Vol. 31 Nº 3. Consultado el 17 de noviembre de 2014. Disponible en <http://www.bioline.org.br/pdf?rc00024>

2.

## CULTIVOS CELULARES



## 2. CULTIVOS CELULARES

### ANTECEDENTE HISTORICO

El cultivo de tejidos se desarrolló a partir de los últimos años del siglo XIX como una continuación de las técnicas de la embriología. Wilhem Roux mantuvo en el año 1885 células de embrión de pollo en solución salina durante unos días.

El zoólogo americano R.G. Harrison es considerado el iniciador de los cultivos de tejidos animales, en 1907, unos años después, Burrows (1910) empleó plasma de pollo para nutrir los explantes de tejidos embrionarios de pollo y en colaboración con Carrel realizaron los primeros intentos de establecer cultivos de células de mamífero, demostraron que la vida del cultivo se puede prolongar mediante subcultivo.

Roux y Jones (1916) emplearon por vez primera extractos enriquecidos en tripsina para disociar las células de embriones de pollo, estableciendo el primer cultivo celular.

Entre los años 1920 y 1940 se desarrollaron diferentes estrategias de obtención de cultivos y de mantenimiento de las condiciones estériles, pero sin grandes avances. A partir de los años 40, con el aislamiento de los primeros antibióticos, se desarrollaron numerosas aplicaciones de entre las que podemos destacar:

- 1948 Earle y Likely, aislaron células de la línea celular L y demostraron que para que una célula llegue a dividirse necesita ser alimentada con los nutrientes correctos.
- 1952 Grey, Coffman y Kubicek, establecen la primera línea celular continua, las actualmente bien conocidas células HeLa.
- 1954 Rita Levi-Montalcini y Calissano establecen que el factor de crecimiento nervioso estimula el crecimiento de los axones en tejidos en cultivo.
- 1961 Hayflick y Moorhead usaron por primera vez antibióticos para prevenir la contaminación de los cultivos de fibroblastos. Pudieron mantener estos cultivos durante unos 12 pases, pero no consiguieron establecer líneas estables.
- 1965 Ham introduce el primer medio definido libre de suero capaz de mantener algunas células de mamífero en cultivo indefinidamente.
- 1969 Augusti-Tocco y Sato establecen la primera línea celular estable de neuroblastoma.
- 1974 Albert Claude, George Palade y Christian de Duve recibían el Premio Nobel de Medicina por haber hecho posible la mirada cercana a ese mundo en miniatura que es la célula con sus estructuras subcelulares y organelos.
- 1975 Kohler y Milstein establecen la primera línea celular híbrida productora de anticuerpos monoclonales.
- 1976 Sato y col. publicaron sus trabajos en los que demuestran que las diferentes líneas celulares requieren mezclas distintas de hormonas y factores de crecimiento para crecer en medios libres de suero. (1)

Actualmente el cultivo celular es ampliamente utilizado y necesario para el diagnóstico virológico. Para llevar a cabo estos cultivos es necesario contar con equipo básico como el que se muestra en el cuadro 2.1.



Cuadro 2.1. Equipo básico de un laboratorio de cultivo celular



Figura 2.1 Campana de flujo laminar



Figura 2.2 Baño termostaticado



Figura 2.3 Incubador CO<sub>2</sub>



Figura 2.4 Autoclave



Figura 2.5 Microscopio Invertido



Figura 2.6 Botellas y placas de cultivo



Figura 2.7 Micro centrifuga



Figura 2.8 Depósito de Nitrógeno líquido



Figura 2.9 Nevera y congelador

### Tipos de cultivos celulares:

#### Cultivos primarios

Se denominan así a aquellos cultivos preparados directamente a partir de un tejido u órgano. Pueden iniciarse con o sin fraccionamiento previo para separar los distintos tipos celulares. En estos cultivos las células están vivas, conservan sus características originales y su proliferación es limitada. Pueden ser removidas del recipiente de cultivo para formar cultivos secundarios. (2)

#### Cultivos secundarios

En estas condiciones las células suelen multiplicarse hasta cubrir la superficie del recipiente de cultivo, formando una *monocapa* (capa de una célula de espesor) más estable. Como consecuencia del contacto entre las células se detiene temporalmente su proliferación, hasta que se las subcultiva a un recipiente con medio fresco. Así, podrán subcultivarse durante semanas o meses. En este estadio, las células frecuentemente mostrarán distintas propiedades según su origen. Por ejemplo, los fibroblastos (células que sintetizan fibras y mantienen la matriz



extracelular del tejido de muchos animales) secretarán colágeno, las células derivadas de tejido muscular esquelético se fusionarán para generar fibras musculares con capacidad contráctil espontánea, las células nerviosas extenderán prolongaciones (axones) eléctricamente excitables que podrán conectarse (establecer sinapsis) con otras células nerviosas, las células epiteliales formarán largas capas con varias propiedades de un epitelio intacto. Gracias a que estos fenómenos ocurren en cultivo, es posible estudiarlos con diferentes metodologías, a veces no aplicables a tejidos intactos. (2)

### Cultivos continuos o líneas celulares

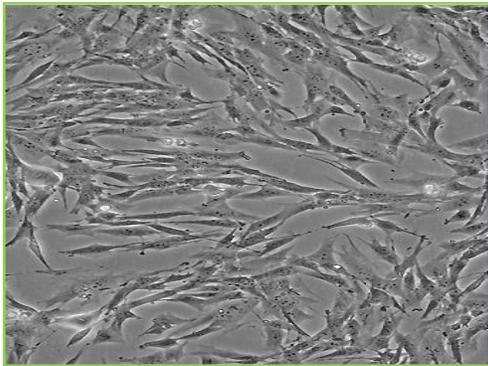
La línea celular es un cultivo celular que tiene alta capacidad de multiplicarse *in vitro*, establecido a partir del primer subcultivo de un cultivo primario y que tiene las mismas características que el tejido de origen. (3)

La mayoría de las células de los vertebrados dejan de dividirse luego de un determinado número de divisiones en cultivo, por un proceso llamado *senescencia celular*. Por ejemplo, los fibroblastos humanos normales se dividen solamente entre 25 y 40 veces en cultivo, antes de detenerse.

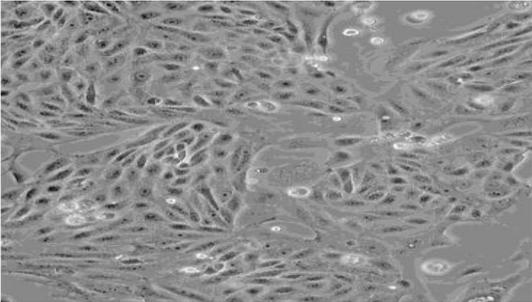
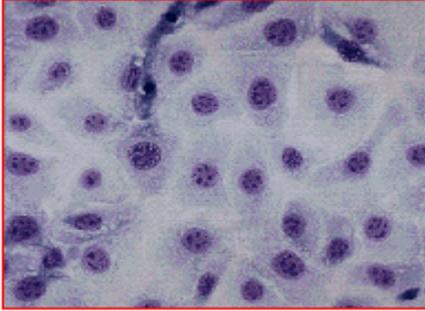
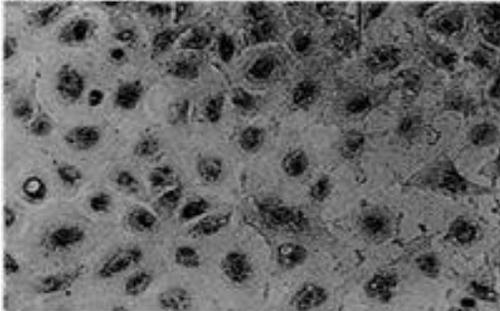
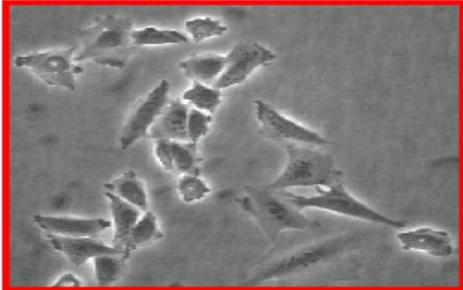
A los fibroblastos humanos se los puede forzar a proliferar indefinidamente si se les provee el gen que codifica para la telomerasa; así, pueden propagarse como una línea celular “inmortalizada”.

Pero como se mencionó, no todas las células humanas se immortalizan de la misma manera. Algunas células, a pesar de que sus telómeros permanezcan largos, pueden frenar sus divisiones celulares como consecuencia de la activación de mecanismos denominados “puntos de control” (*check points*) del ciclo celular. Para immortalizar estas células, hay que lograr la inactivación de los *check-points*. Una forma de hacerlo es introducir ciertos “*oncogenes*” (genes promotores del cáncer) que pueden obtenerse de virus que causan cáncer, como algunas cepas del virus del papiloma humano, adenovirus, etc. (2) En el cuadro 2.2 se muestran las características de diversas líneas celulares y su morfología.

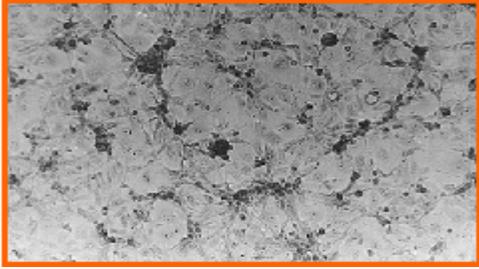
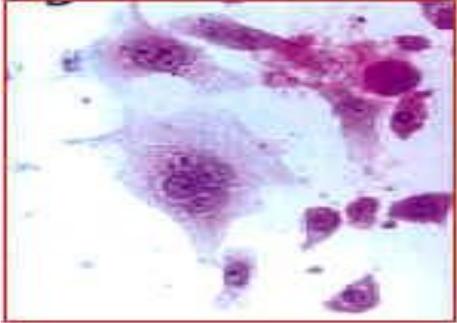
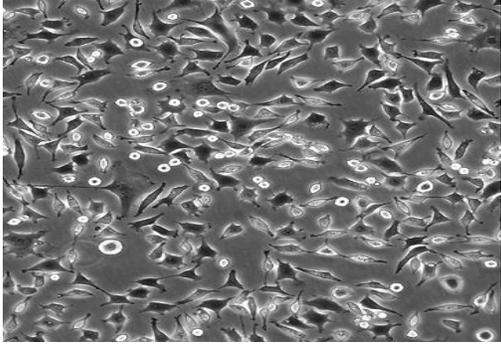
#### Cuadro 2.2. Ejemplos de líneas celulares

<p style="text-align: center;"><b>BHK-21</b> <b>(Baby hamster kidney fibroblasts).</b></p> <p><b>Origen:</b> Línea celular procedente de riñón normal de <i>Mesocricetus auratus</i> (hamster, Syrian golden).</p> <p><b>Morfología:</b> Fibroblasto.</p> <p>Es susceptible a los virus de la rabia, herpes simple, rubéola, estomatitis vesicular (Indiana), reovirus, fiebre aftosa, adenovirus, encéfalo-mielocarditis porcina, lengua azul, encefalitis equina del este, peste porcina clásica y enfermedad de Aujeszky.</p>	 <p><b>Figura 2.10</b> Monocapa de fibroblastos de riñón de hámster sirio.</p>
--	--

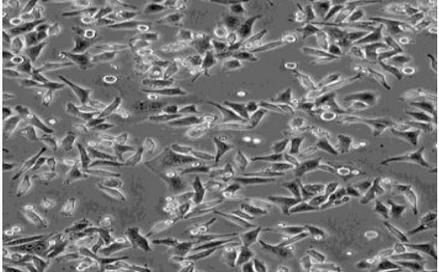
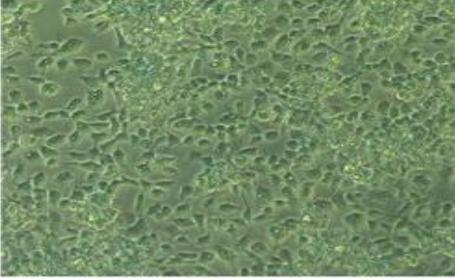
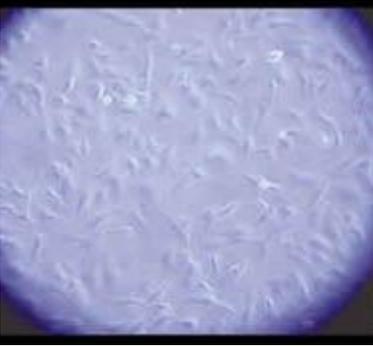


<p style="text-align: center;"><b>MDCK</b> <b>(Madin-Darby canine kidney).</b></p> <p><b>Origen:</b> línea celular procedente de riñón normal de una cocker spaniel adulto.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Esta línea es susceptible a los virus de la influenza A y B, fiebre viral porcina, reovirus 2 y 3, estomatitis vesicular (Indiana), hepatitis y moquillo canino y coxsackie B5.</p>	 <p><b>Figura 2.11</b> Monocapa epitelial de riñón canino</p>
<p style="text-align: center;"><b>MDBK</b> <b>(Madin-Darby bovine kidney).</b></p> <p><b>Origen:</b> Línea celular procedente de riñón normal de bovino.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Es susceptible a los virus de la estomatitis vesicular, parainfluenza 3, rinotraqueitis infecciosa bovina y diarrea viral bovina.</p>	 <p><b>Figura 2.12</b> Monocapa epitelial de riñón bovino</p>
<p style="text-align: center;"><b>PK-15</b> <b>(Porcine kidney).</b></p> <p><b>Origen:</b> Línea celular procedente de riñón de porcino.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Susceptibilidad a adenovirus 4 y 5, pseudorrabia porcina, estomatitis vesicular (Indiana), fiebre viral porcina, reovirus 2 y 3, Coxsackie B2, B3, B4, B5 y B6, peste porcina clásica, encéfalomiocarditis porcina, parvovirus y circovirus porcino y enfermedad de Aujeszky</p>	 <p><b>Figura 2.13</b> Monocapa epitelial de riñón porcino</p>
<p style="text-align: center;"><b>CHO-K1</b> <b>(Chinese hamster ovary).</b></p> <p><b>Origen:</b> Línea celular procedente de la biopsia del ovario de hámster chino adulto.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Susceptible a estomatitis vesicular (Indiana), arbovirus Getah y meningovirus.</p>	 <p><b>Figura 2.14</b> Monocapa epitelial de ovario de hámster chino</p>



<p style="text-align: center;"><b>MA 104</b></p> <p><b>Origen:</b> Línea celular procedente de riñón de mono verde africano.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Susceptible a rotavirus, arbovirus, síndrome respiratorio y reproductivo porcino, enfermedad de Aujeszky.</p>	 <p><b>Figura 2.15</b> Monocapa epitelial del embrión de riñón de mono verde africano</p>
<p style="text-align: center;"><b>HeLa 229 (Henrietta Lacks).</b></p> <p><b>Origen:</b> Línea celular procedente de cáncer cérvico uterino.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Susceptible a adenovirus 3, sarampión, poliovirus 1, echovirus, vaccinia, arbovirus, virus sincicial respiratorio, reovirus 3, rinovirus, Coxsackie, estomatitis vesicular (Indiana).</p>	 <p><b>Figura 2.17</b> Monocapa epitelial de carcinoma de cérvix humano</p>
<p style="text-align: center;"><b>L-929 (Tejido conectivo de ratón).</b></p> <p><b>Origen:</b> La cepa L deriva de tejido areolar subcutáneo normal y tejido adiposo de un ratón C34/An, macho de 100 días.</p> <p><b>Morfología:</b> Fibroblasto.</p> <p>Susceptible a pseudorrabia, herpes simple, estomatitis vesicular (Indiana).</p>	 <p><b>Figura 2.18</b> Monocapa epitelial de tejido conectivo de ratón</p>
<p style="text-align: center;"><b>CRFK (Crandell Rees feline kidney)</b></p> <p><b>Origen:</b> Línea celular procedente de riñón de gato.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Susceptible a picornavirus felino, rabia, parvovirus canino, inmunodeficiencia felina, herpes felino, calicivirus, panleucopenia felina y reovirus.</p>	 <p><b>Figura 2.19</b> Monocapa de fibroblastos de riñón de gato</p>



<p style="text-align: center;"><b>HEp-2</b></p> <p><b>Origen:</b> Es una cepa derivada de la línea celular HeLa, surgida posiblemente como producto de una contaminación cruzada durante las primeras etapas del cultivo.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Susceptible a adenovirus 3, sarampión, poliovirus 1, echovirus, herpes simple, arbovirus, estomatitis vesicular (Indiana), el virus sincicial respiratorio, virus Newcastle.</p>	 <p><b>Figura 2.20</b> Monocapa epitelial de carcinoma humano</p>
<p style="text-align: center;"><b>C6/36</b></p> <p><b>Origen:</b> Mosquito, <i>Aedes Aegypti</i>.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelial. Larvas del mosquito.</p> <p>Se utiliza para estudios del virus: Arbovirus.</p>	 <p><b>Figura 2.21</b> Monocapa de células C6/36 sin infección.</p>
<p style="text-align: center;"><b>Vero</b> ("Verda Reno- riñón verde")</p> <p><b>Origen:</b> Es una cepa derivada de riñón de mono verde africano.</p> <p><b>Morfología:</b> Epitelio.</p> <p>Susceptible a poliovirus 3, echovirus, reovirus, rubéola, herpes simple, arbovirus, adenovirus, influenza, paramixovirus, Getah arbovirus, ortomixovirus, virus de la fiebre africana porcina, leucosis bovina, orbivirus, virus de la diarrea epidérmica porcina.</p>	 <p><b>Figura 2.22</b> Cultivo de células Vero.</p>

(4)



Cuadro 2. 3. Nutrientes requeridos para el crecimiento y mantenimiento celular

	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Es una solución salina isotónica.</li> <li>• Glucosa.</li> <li>• Vitaminas, coenzimas; aminoácidos.</li> <li>• Solución "bufferada" a pH 7.2 a 7.4 o con bicarbonato, ambos buffer a base de fosfatos pueden sustituirse con HEPES (ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-2-etanosulfónico) o TES (ácido N-tris-(hidroximetil)metil-2-aminometanosulfónico) proveen mejor estabilidad del pH y reducen los requerimientos de CO<sub>2</sub>.</li> <li>• Rojo de fenol como indicador de pH.</li> <li>• Además contienen antibióticos para inhibir el crecimiento bacteriano</li> <li>• Suero fetal bovino máximo 10%</li> </ul>
<p>Yellow  Red</p> <p>Figura 2.23 Solución bufferada</p>	

(5)

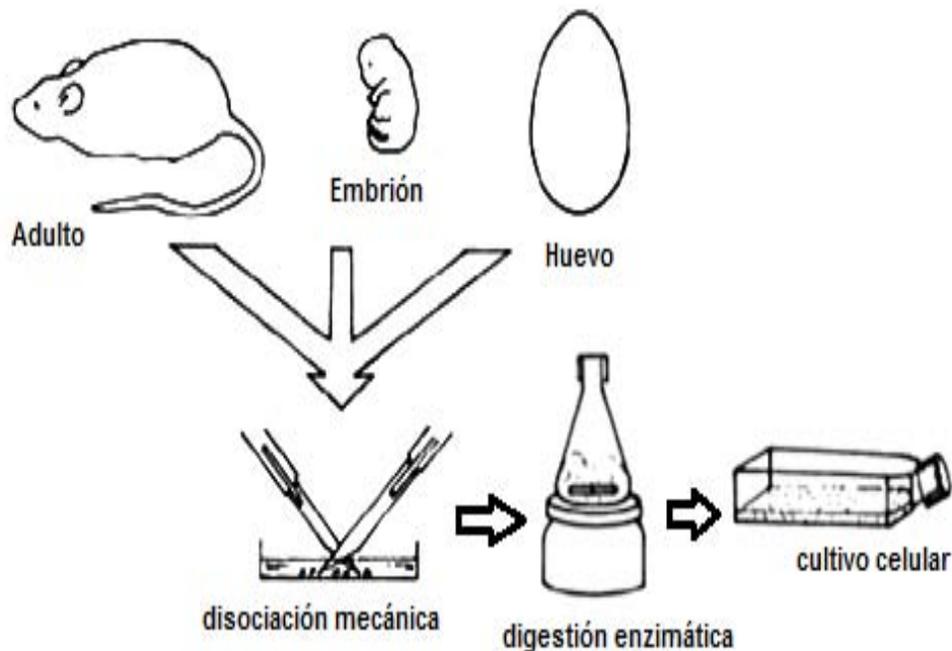


Figura 2.24 Pasos de un cultivo primario

En el cuadro 2.3 se muestran los requerimientos básicos de nutrientes para un cultivo celular, mientras que en la figura 2.24 se esquematizan los pasos para un cultivo primario.



### Tipos de crecimiento celular.

- Crecimiento en monocapa. Las células se adhieren al sustrato, creciendo y dividiéndose en una única capa celular (monocapa). Puede ser:
  - Estacionario: Las células incubadas sin agitación, sedimentan y se adhieren al fondo del envase, usualmente liso.
  - Rotatorio: Envase de cultivo cilíndrico, que gira lentamente de modo que las células se unen a la superficie interna del frasco.
- Crecimiento en suspensión. Las células se multiplican en medio líquido sin adherirse a ningún sustrato. (3)

### Fases del cultivo

- **Fase de latencia** (período lag). Fase inicial de crecimiento durante la cual el número de células se mantiene relativamente constante, antes de dar comienzo a la fase de división celular rápida. Es una fase de adaptación a la vida “*in vitro*”.
- **Fase de crecimiento exponencial**. El número de células se duplica aproximadamente cada 24 horas.
- **Fase de confluencia**. Las células del cultivo, que se ha saturado, dejan de dividirse (monocapa: inhibición por contacto; suspensión: consumo del medio).
- **Fase de muerte**. Si el cultivo se prolonga por demasiado tiempo, las células entran en una fase de senescencia que termina con la muerte de las células en cultivo. (6)

### Infección de cultivo celular

Para infectar un cultivo celular primero se prepara el cultivo y el inóculo de virus. El cultivo se inócula con una carga definida de virus, luego de inóculado el cultivo celular, se incuba a 35-37°C por un período de hasta 14 días promedio, esperando la aparición de efecto citopático, toxicidad o degeneración celular, observando el cultivo al microscopio a las 24, 48, 72h y luego 2 veces por semana.

Se usan cultivos celulares no inóculados para control y comparación con cualquier cambio morfológico observado en los cultivos inóculados. El efecto citopático es la visualización de cambios morfológicos más o menos característicos en las células inóculadas producidas por la acción del virus sobre el cultivo celular (Figura 2.25).

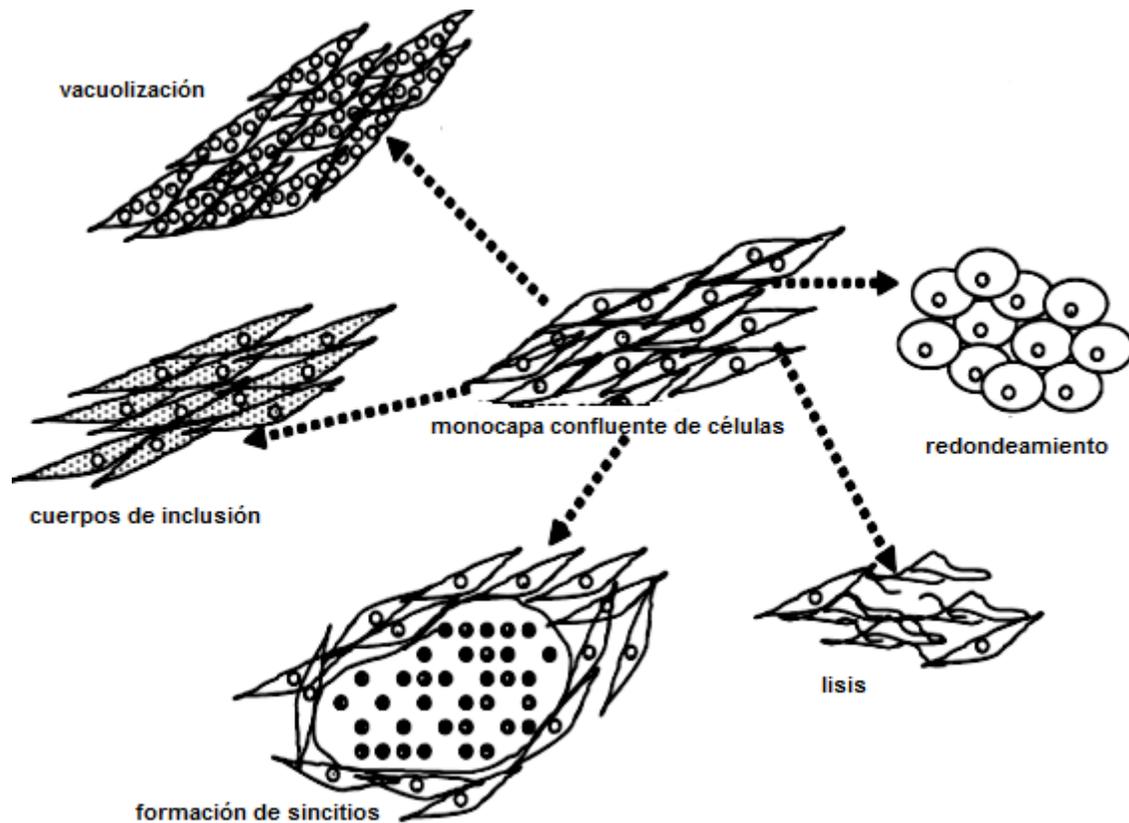


Figura 2.25 Tipos de efecto citopático

Cuando los virus no producen efecto citopático, se puede recurrir a técnicas que ponen en evidencia la presencia de aquel en el cultivo. Las más usadas son: hemadsorción, hemaglutinación y tinciones con anticuerpos monoclonales.

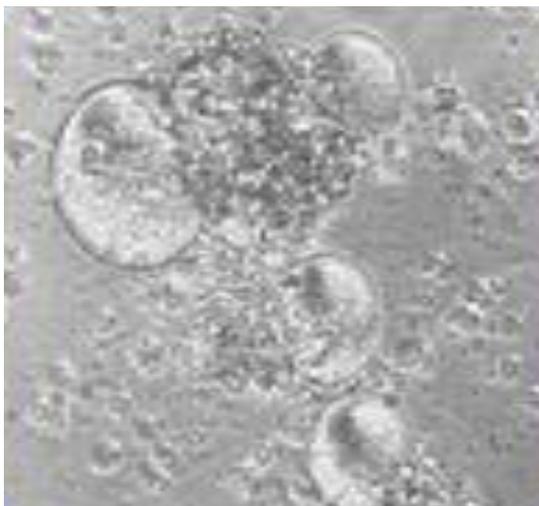


Figura 2.26 Sincicios

Los sincicios son grupos de células fusionadas apreciables como una masa celular multinucleada.

(7)



Cuadro 2.4 Efecto citopático de algunos virus sobre los cultivos celulares

Virus	Efecto
<b>Picornavirus</b>	Células redondeadas, muerte y destrucción de la monocapa celular
<b>Herpesvirus</b>	Englobamiento celular, más con el tipo 2 que con el tipo 1
<b>Adenovirus</b>	Agrupación de células redondeadas parecidos a racimos de uvas
<b>Paramyxovirus</b>	Células gigantes multinucleadas sincicios (fusión celular)

(5)

### Criopreservación.

La criopreservación tiene como objetivo el mantenimiento de la viabilidad y funcionabilidad celular a temperaturas bajas. La criobiología se refiere a entender los efectos de las temperaturas bajas sobre los sistemas celulares ya que el tiempo biológico es una consecuencia de determinadas reacciones bioquímicas y el frío prolonga el tiempo biológico puesto que enlentece estas reacciones. Sin embargo, este no es un proceso exento de problemas ya que puede inducir variaciones extremas en las propiedades químicas, térmicas y eléctricas las cuales pueden alterar las membranas celulares, los organelos y la delicada interacción célula-célula inherente en las células y tejidos a criopreservar.<sup>(8)</sup>

La criopreservación de los cultivos celulares es importante para mantener reservas que son necesarias para tener células disponibles en caso de contaminación y principalmente para disponer de “stocks” de bajo pasaje, pues las células en uso se envejecen con cada pase, y pueden sufrir mutaciones y cambios fenotípicos, hasta que finalmente se degeneran, a menos que sea una línea celular continua o inmortal.

El proceso de congelación es letal para la célula debido a los efectos de los cristales de hielo, que dañan las membranas particularmente al momento de la descongelación. Por tanto, es necesario utilizar agentes crioprotectores y altas concentraciones de SFB (entre 20 y 90%).

Se congelan células que se encuentran en fase logarítmica de crecimiento. La velocidad o tasa del enfriamiento es variable según el tipo de células pero, en general, debe ser de 1 a 3°C por minuto.<sup>(9)</sup>

Durante la congelación, la mayoría del agua se transforma en hielo, cesando el metabolismo celular (Ver figura 2.27 y 2.28). La formación de hielo se inicia en el medio extracelular, lo que provoca un aumento de la concentración de sales debido a la disminución del agua cuando ésta se transforma en hielo, es decir, se produce un desequilibrio osmótico. Entonces el agua sale de las células por ósmosis y se produce una deshidratación celular, la cual puede ir en detrimento de una posterior recuperación celular.<sup>(10)</sup>



Al contrario de la congelación, el proceso de descongelación debe ser muy rápido para prevenir la formación de cristales cuando la temperatura baja de  $-50^{\circ}$  a  $0^{\circ}\text{C}$ .

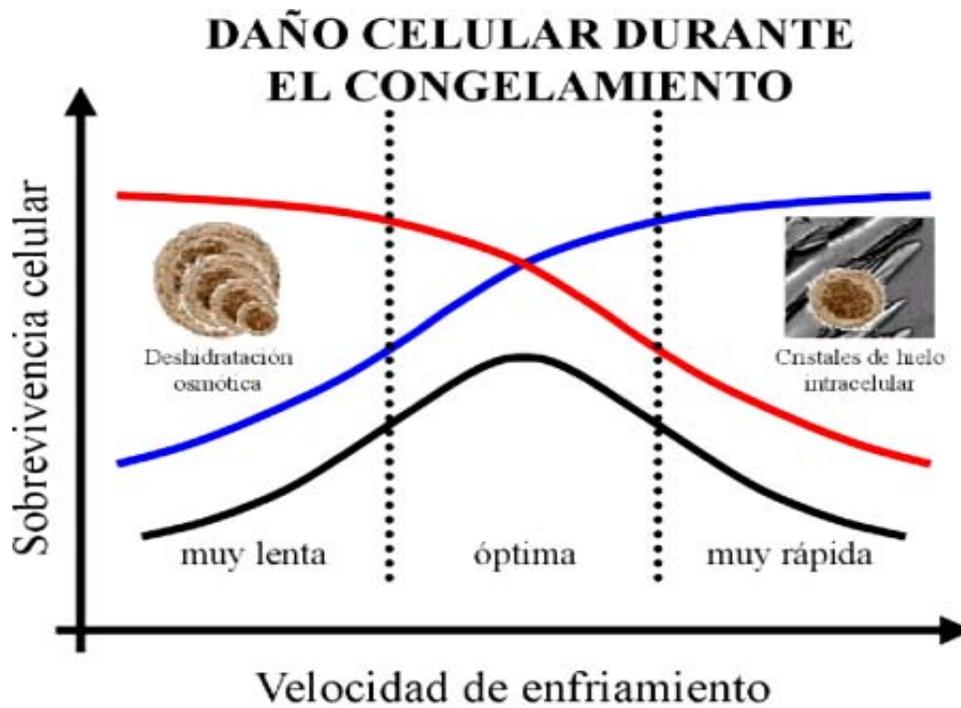


Figura 2.27 Curvas de supervivencia de células según la velocidad de congelación.

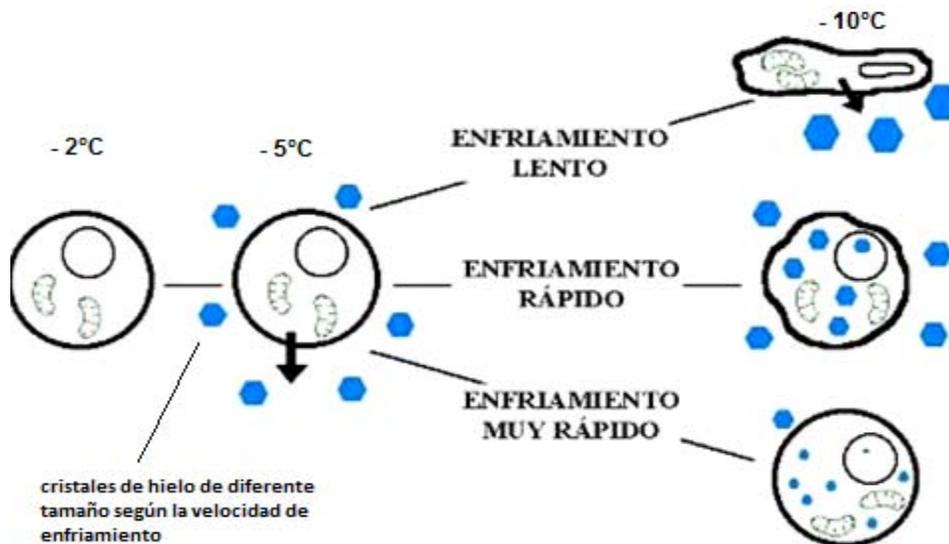


Figura 2.28 Esquema de los eventos físicos ocurridos en el congelamiento.



---

## Referencias

1. Cultek (2007). Cultivos celulares. Consultado el 11 de agosto de 2013. Disponible en [http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica\\_Cultivos\\_Celulares\\_2007.pdf](http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Cultivos%20Celulares/Aplica_Cultivos_Celulares_2007.pdf)
2. Segretín, María Eugenia. Los cultivos celulares y sus aplicaciones I (cultivos de células animales). En ArgenBio, Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Consultado el 11 de agosto de 2013. Disponible en <http://www.argenbio.org/adc/uploads/pdf/Cultivos%20celulares%20I%20Euge.pdf>
3. Aspectos básicos sobre el manejo y preservación de los cultivos celulares (2010). Consultado el 20 de octubre de 2014. Disponible en <http://www.paho.org/hq/dmdocuments/2010/L%20Brito%20INHRR.pdf>
4. Durán, R (2005). Importancia biológica en la multiplicación de las líneas celulares estables: III. Tipos y líneas. En revista digital del centro nacional de investigaciones agropecuarias de Venezuela. Consultado el 24 de agosto de 2013. Disponible en [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/ceniaphoy/articulos/n9/arti/duran\\_r/arti/duran\\_r.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n9/arti/duran_r/arti/duran_r.htm)
5. Virología. Cultivo de virus. Consultado el 24 de agosto de 2013. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/14155499/Virologia-Cultivo-de-Virus-316>
6. Cultivos celulares. Métodos y técnicas de estudio en biología celular. Consultado el 24 de agosto 2013. Disponible en [www.uib.cat/depart/dba/cellbiology/Cultivos%20Celulares.ppt](http://www.uib.cat/depart/dba/cellbiology/Cultivos%20Celulares.ppt)
7. Metodología general para el estudio de microorganismos. Tema: Cultivo celular. Cultivo de rickettsias, clamidias y virus. Inoculación en embrión de pollo. Animales de experimentación. Consultado el 24 de agosto de 2013. Disponible en <http://microbiologiaunsl.wikispaces.com/file/view/Metodolog%C3%ADa+estudio+de+microor.+diapo+2014+%5BModo+de+compatibilidad%5D.pdf>
8. Fundamentos de criopreservación (2006) en Revista colombiana de obstetricia y ginecología Vol. 57, No. 4. Consultado el 20 de octubre de 2014. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=195214318008>



9. Cultivos celulares. Consultado el 20 de octubre de 2014. Disponible en <http://editorialbiogenesis.udea.edu.co/index.php/biogenesis/article/viewFile/158/158>
10. Consultado el 20 de octubre de 2014. Disponible en [http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion\\_Almacenamiento&opc=tecnicas&idap=58](http://www.cultek.com/aplicaciones.asp?p=Aplicacion_Almacenamiento&opc=tecnicas&idap=58)

### Imágenes.

- Figura 2.1 – Recuperado de <http://www.jaelsa.com/laboratorio4>
- Figura 2.2 – Recuperado de <http://www.solostocks.com/venta-productos>
- Figura 2.3 – Recuperado de <http://www.inilab.es/incubadores-co2-modelo-5215>
- Figura 2.4 – Recuperado de <http://www.ecomedltd.com>
- Figura 2.5 – Recuperado de <http://cmcmantu.blogspot.mx/2013/03/la-biotecnologia.html>
- Figura 2.6 – Recuperado de <http://taqbio.com/project/mobile-app-design/>
- Figura 2.7 – Recuperado de <http://labolan.es>
- Figura 2.8 – Recuperado de <http://www.planeta-curioso.com>
- Figura 2.9 – Recuperado de <http://www.cultek.com>
- Figura 2.10, 2.12, 2.14, 2.15, 2.16, 2.17, 2.19 – [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/ceniaphoy/articulos/n9/arti/duran\\_r/arti/duran\\_r.htm](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n9/arti/duran_r/arti/duran_r.htm)
- Figura 2.11 – Recuperado de <http://www.atcc.org/~media/Attachments/3/D/9/D/1766.ashx>
- Figura 2.13 – Recuperado de <http://www.growth-media.net/Product/855/#.VDLiPha-5DR>
- Figura 2.18 – Recuperado de <http://www.atcc.org/~media/Attachments/F/4/6/2/1754.ashx>
- Figura 2.20 – Recuperado de <http://www.atcc.org/~media/Attachments/9/F/8/4/1760.ashx>
- Figura 2.21 – Recuperado de [http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1812-95282009000100010&script=sci\\_arttext](http://scielo.iics.una.py/scielo.php?pid=S1812-95282009000100010&script=sci_arttext)
- Figura 2.22 – Recuperado de [http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0365-66912006000700005&script=sci\\_arttext](http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S0365-66912006000700005&script=sci_arttext)
- Figura 2.23, 2.24 – Recuperado de [www.uib.cat/depart/dba/cellbiology/Cultivos%20Celulares.ppt](http://www.uib.cat/depart/dba/cellbiology/Cultivos%20Celulares.ppt)



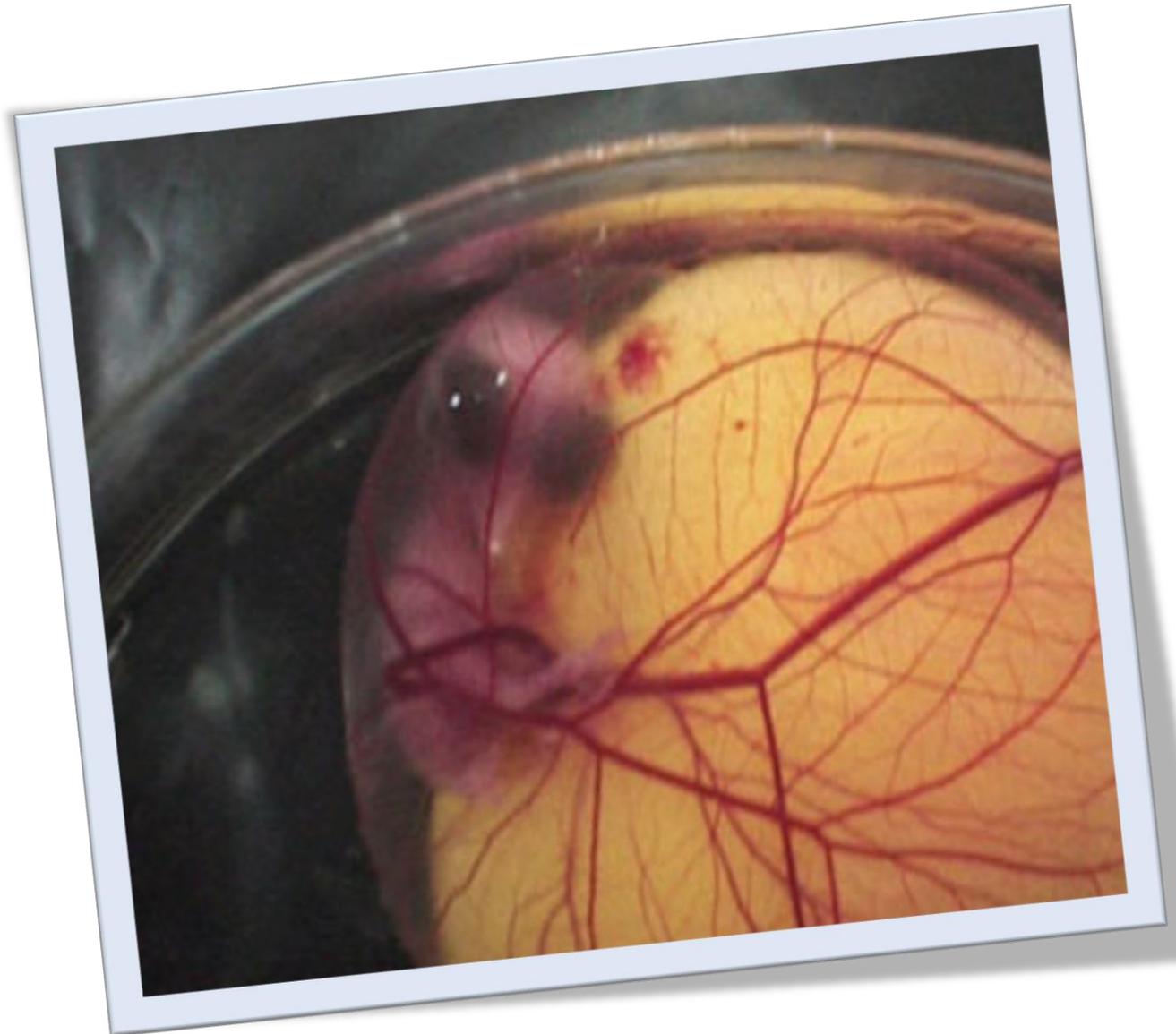
---

Figura 2.26 – Recuperado de  
<http://microbiologiaunsl.wikispaces.com/file/view/Metodolog%C3%ADa+estudio+de+microor.+diapo+2014+%5BModo+de+compatibilidad%5D.pdf>

Figura 2.27, 2.28 - <http://albeitar.portalveterinaria.com/noticia/3356/Articulos-rumiantes-archivo/Congelaci%oacuten-y-vitrificaci%oacuten-de-embriones-ovinos.-Aspectos-b&acutesicos-y-aplicados.-Experiencias-en-Uruguay.html>

3.

## HUEVOS EMBRIONADOS



### 3. HUEVOS EMBRIONADOS

#### ANTECEDENTE HISTORICO

El cultivo de virus gripal en huevo embrionado fue empleado por primera vez por Burnet en 1935, demostrando que el embrión de pollo es un medio muy sensible para el aislamiento de virus, siendo además un medio estéril y poco costoso. Ha sido posible cultivar virus de diversos grupos en varias cavidades del huevo fecundado, o en el propio embrión en desarrollo. También se emplearon huevos de pato y de ganso para cultivar ciertos virus, pues estos animales tienen un periodo de incubación más prolongado que el pollo; pero como regla, sigue usándose huevo de gallina de 6 a 8 días de incubación aproximadamente (a veces se usa huevos de más tiempo de incubación).

Los virus sólo pueden reproducirse en determinadas partes del embrión; por consiguiente, se deben inyectar en la región apropiada, por ejemplo los mixovirus crecen bien en la membrana corioalantoidea, en tanto que el virus de la parotiditis prefiere la cavidad alantoidea.

El método exacto de inoculación y la edad del embrión que se emplea, dependen del virus problema, por ejemplo para aislar en forma primaria el virus de la influenza a partir de material recogido de la garganta, suele inocularse este en la cavidad amniótica de embriones de 7 a 8 días; pero el virus se duplica fácilmente en la membrana alantoidea de embriones de 12 a 13 días, después de varias resiembras (“adaptación”) en el amnios. Los focos más utilizados para la inoculación, a parte de las cavidades amniótica y alantoidea, son la membrana corioalantoidea y el saco vitelino. Algunas veces, puede inyectarse directamente el virus en el embrión en desarrollo, recurriendo a la inoculación intravenosa, intraperitoneal o intracerebral. Una vez que se duplicó el virus dentro de las células de las membranas o del embrión, puede liberarse a los líquidos vecinos, los cuales constituyen entonces una buena fuente de virus, por ejemplo el virus de la influenza, que se duplica en el sistema respiratorio del embrión y en las células de la membrana amniótica, pasa al líquido amniótico, que luego puede recogerse con una jeringa y aguja. En cambio, otros virus, como los de la viruela y el herpes, que se duplican en la membrana corioalantoidea, siguen unidos a las células en las lesiones o “pústulas” que se forman sobre dicha membrana. Al moler y deshacer en una solución salina isotónica las membranas, logran liberarse estos virus.

En consecuencia el crecimiento de un virus en un embrión de pollo (EP) puede provocar la muerte del embrión (ejemplo virus de la encefalitis), producir pústulas o placas sobre la membrana corioalantoidea (como herpes, viruela vacuna), desarrollar hemaglutininas en los líquidos o tejidos embrionarios (ejemplo influenza) o desarrollar virus infectante (ejemplo



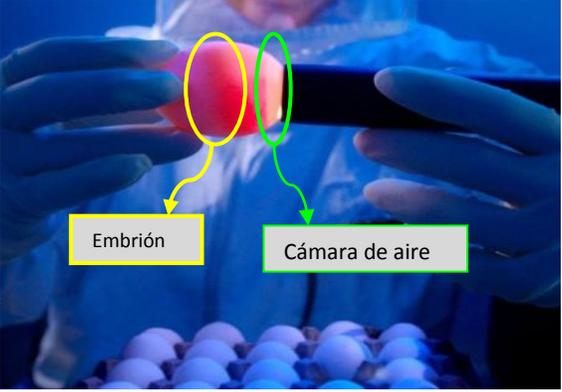
poliovirus tipo 2). En el caso de los virus herpes y vaccinia, estos se pueden cuantificar por la técnica de inoculación de huevos embrionados al correlacionar el número de pústulas contadas con la dilución viral inoculada. (1)

**Factores que influyen en el desarrollo del virus en EP.**

- Edad.
- Vía de inoculación.
- Tipo y volumen del inóculo.
- Condiciones de incubación.
- Condiciones de las aves.

**Estructuras y técnicas de inoculación del EP.**

**Cuadro 3.1 Procedimiento para localizar las estructuras de un embrión de pollo.**

<p>Con ayuda del ovoscopio localizar la cámara de aire y el embrión por transiluminación.</p>	 <p><b>Figura 3.1</b> Selección del huevo.</p>
<p>Quitar la parte de la cámara de aire.</p>	 <p><b>Figura 3.2</b> Cámara de aire</p>



Colocar el embrión en una caja Petri.



Figura 3.3 Embrión de pollo.

Ubicar y observar las estructuras.

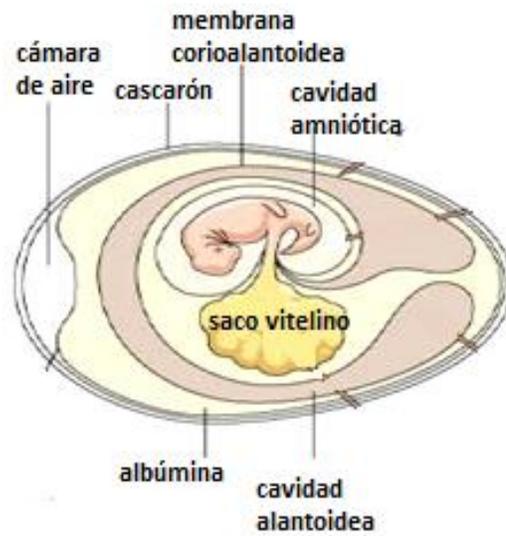


Figura 3.4 Partes del embrión de pollo.



Cuadro 3.2 Técnicas de inoculación en EP.

CAVIDAD ALANTOIDEA	
Técnica de inoculación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seleccionar los embriones vivos por transluminación.</li> <li>• Localizar el embrión.</li> <li>• Desinfectar zona de inoculación.</li> <li>• Perforar.</li> <li>• Preparar inóculo.</li> <li>• Introducir aguja.</li> <li>• Depositar inóculo.</li> <li>• Retirar aguja y sellar con barniz.</li> <li>• Rotular con lápiz: materia, equipo, fecha, y virus inoculado.</li> <li>• Incubar durante el periodo y l temperatura adecuada del virus inoculado.</li> </ul>
<p><b>Figura 3.5</b> Inoculación cavidad alantoidea.</p>	
Características del embrión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad del embrión: 9 a 11 días.</li> <li>• Volumen del inóculo: 0.1 a 0.2 mL.</li> </ul>
Virus.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus de la Enfermedad de Newcastle.</li> <li>• Virus de la Bronquitis Infecciosa.</li> <li>• Virus de Influenza.</li> <li>• Virus de las Paperas.</li> <li>• Virus de la Encefalitis Equina del Oeste.</li> <li>• Virus de la Encefalitis Equina del Este.</li> <li>• Virus de la Encefalitis Equina de Venezuela.</li> </ul>
Efecto.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muerte embrionaria.</li> </ul>



CAVIDAD AMNIÓTICA	
Técnica de inoculación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Seleccionar los embriones vivos por transiluminación.</li> <li>• Localizar el embrión.</li> <li>• Desinfectar zona de inoculación.</li> <li>• Perforar.</li> <li>• Preparar inculo.</li> <li>• Introducir aguja en la cavidad amniótica observando al embrión en el ovoscopio.</li> <li>• Depositar inculo.</li> <li>• Retirar aguja y sellar con barniz.</li> <li>• Rotular con lápiz: materia equipo, fecha, y virus inoculado.</li> <li>• Incubar durante el periodo y temperatura adecuada del virus inoculado.</li> </ul>
<p>The diagram illustrates the internal structure of an egg. It shows an outer shell, an inner shell, and a yolk. The air chamber (cámara de aire) is located at the top. The amniotic cavity (cavidad amniótica) is shown as a space containing the embryo and yolk. A syringe is shown injecting into the amniotic cavity, labeled as 'inoculación cavidad amniótica'.</p>	
<p><b>Figura 3.6</b> Inoculación cavidad amniótica.</p>	
Características del embrión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad del embrión: 7 a 10 días.</li> <li>• Volumen del inculo: 0.1 a 0.2 mL.</li> </ul>
Virus.	<ul style="list-style-type: none"> <li style="width: 50%;">• Virus de la Enfermedad de Newcastle.</li> <li style="width: 50%;">• Virus de la Encefalitis Equina del Oeste.</li> <li style="width: 50%;">• Virus de la Bronquitis Infecciosa.</li> <li style="width: 50%;">• Virus de la Encefalitis Equina del Este.</li> <li style="width: 50%;">• Virus de Influenza (primoaislamiento).</li> <li style="width: 50%;">• Virus de la Encefalitis Equina de Venezuela.</li> <li style="width: 50%;">• Virus de las Paperas.</li> </ul>
Efecto.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muerte embrionaria</li> </ul>



MEMBRANA CORIOALANTOIDEA (MCA)	
Técnica de inoculación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Perforar el embrión de pollo en dos sitios (cámara de aire y en un costado del huevo embrionado).</li> <li>• En el orificio de la cámara de aire colocar una propipeta y generar vacío.</li> <li>• Al mismo tiempo en el orificio del costado introducir ligeramente la aguja e inocular. Sellar los orificios con barniz.</li> <li>• Después de incubar, quitar el cascaron conservando la MCA en el cascarón.</li> <li>• Colocar el EP en una caja Petri y observar los efectos causados en el EP y en la MCA.</li> </ul>
<p><b>Figura 3.7</b> Inoculación membrana corioalantoidea.</p>	
Características del embrión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad del embrión: 11 a 13 días.</li> </ul> <p style="text-align: right;">Volumen del inoculo: 0.1 a 0.5 mL.</p>
Virus.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus de la enfermedad de Aujeszky.</li> <li>• Virus de la Laringotraqueitis Infecciosa.</li> <li>• Virus de la Viruela Aviar.</li> </ul>
Efecto.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pústulas en la membrana.</li> </ul>



SACO VITELINO	
Técnica de inoculación.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Localizar el embrión por transiluminación.</li> <li>• Marcar con una X sobre la cámara de aire al lado opuesto del embrión.</li> <li>• Desinfectar zona de inoculación.</li> <li>• Perforar.</li> <li>• Preparar inóculo.</li> <li>• Introducir aguja.</li> <li>• Depositar inóculo.</li> <li>• Retirar aguja y sellar con barniz.</li> <li>• Rotular con lápiz: materia equipo, fecha, y virus inoculado.</li> <li>• Incubar durante el periodo y temperatura adecuada del virus inoculado.</li> </ul>
<p><b>Figura 3.8</b> Inoculación del saco vitelino.</p>	
Características del embrión.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Edad del embrión: 6 a 8 días.</li> <li>• Volumen del inóculo: 0.1 a 1.0 mL.</li> </ul>
Virus.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Virus sincitial respiratorio.</li> </ul>
Efecto.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Muerte embrionaria.</li> </ul>



---

#### Indicadores de infección.

- Hemorragias subcutáneas.
- Congestión de la epidermis.
- Retorcimiento y enanismo del embrión de pollo.
- Engrosamiento de membranas.
- Disminución de volumen de las cavidades.
- Pústulas.
- Desarrollo anormal de plumas. (2,3)



#### REFERENCIAS

1. Inoculación de virus en huevos embrionados. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Escuela Profesional de Biología. Consultado el 3 de agosto del 2013. Disponible en <https://es.scribd.com/doc/6851738/Virologia-Practica-05-Inoculacion-de-virus-en-huevos-embriados>
2. Pruebas de infectividad de virus y diagnóstico serológico. Universidad Nacional Pedro Ruiz Gallo Facultad de Ciencias Biológicas. Consultado el 1 de agosto del 2013. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/6426331/Pruebas-de-Infectividad-y-Diagnostico-Serologico-en-Virologia>
3. Burleson F.G., T.M. Chambers and D.L. Wiedbrauk (1992) Virology: a laboratory manual. Academic Press San Diego, Sydney (pp. 45-51)

#### Imágenes.

Figura 3.1- Recuperado de [http://diariodebiologia.com/2010/08/e-verdade-que-a-vacina-da-gripe-e-feita-no-ovo-da-galinha/#.VDQ\\_Axa-5DQ](http://diariodebiologia.com/2010/08/e-verdade-que-a-vacina-da-gripe-e-feita-no-ovo-da-galinha/#.VDQ_Axa-5DQ)

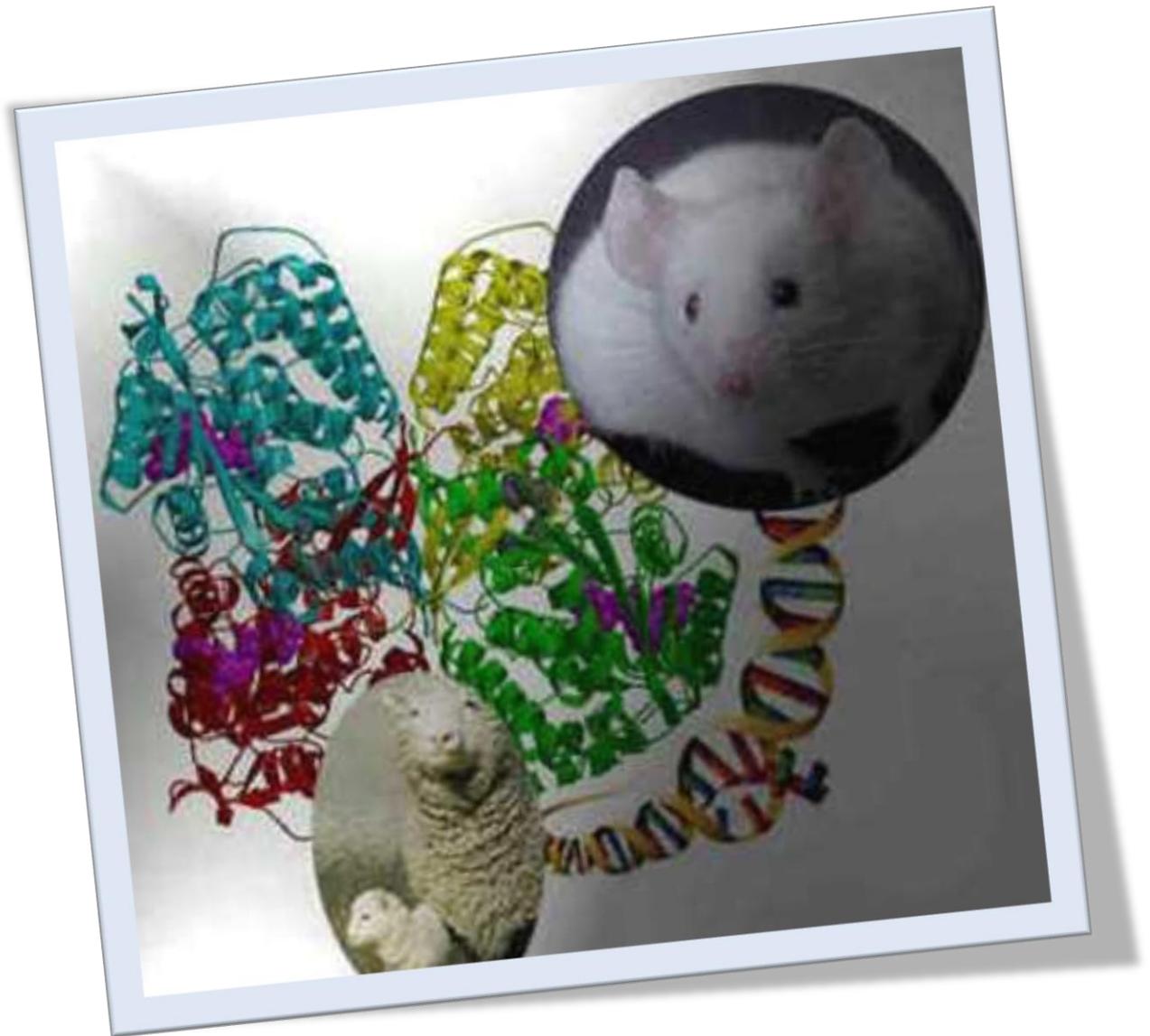
Figura 3.2- Recuperado de <http://elprofesordeciencias.blog.com.es/2011/01/10/nuevo-metodo-para-dejar-de-usar-huevos-de-gallina-para-fabricacion-de-las-vacunas-de-gripe-10339696/>

Figura 3.3- Recuperado de <http://mibiolaboratorio.blogia.com/temas/desarrollo-embionario-de-los-pollos.php>

Figura 3.4, 3.5, 3.6, 3.7, 3.8 - Recuperado de <https://es.scribd.com/doc/6426331/Pruebas-de-Infectividad-y-Diagnostico-Serologico-en-Virologia>

4.

## ANIMALES DE LABORATORIO



## 4. ANIMALES DE LABORATORIO.

### ANTECEDENTE HISTORICO

Cada año se utilizan millones de animales en el mundo para la experimentación científica. Son difíciles de obtener cifras exactas ya que en muchos países, México entre ellos, las autoridades no las exigen. Los animales son usados primordialmente en las siguientes áreas: experimentación científica, pruebas de constatación, diagnóstico, elaboración de vacunas y enseñanza.

El uso de seres vivos con el fin de adquirir conocimientos data de épocas lejanas. En la antigüedad se practicaba la vivisección no sólo en animales, también en seres humanos. Los reyes de Persia les permitían a sus médicos experimentar con hombres condenados a muerte.

Leonardo da Vinci (1452-1519) contribuyó al conocimiento de la anatomía comparada en perros y gatos pero predijo que algún día la experimentación en animales sería juzgada como crimen. Otros hombres de ciencia de los siglos XVI, XVII y XVIII, entre ellos Graaf, Harvey, Malpighi, Aselli y Haller estudiaron aspectos de fisiología e histología por medio de la experimentación en animales. No se conocía la anestesia y se justificó el sufrimiento provocado por una parte con el hecho de adquirir conocimientos y por otra aceptando que los animales no sentían, puesto que no tenían alma. Este modo de pensar fue confirmado por Santo Tomás de Aquino (siglo XIII), quien expresó: “no tienen razón, no tienen derechos, por lo tanto el ser humano no tiene responsabilidades hacia ellos”. Más tarde Descartes (1596-1650) aseguró que las respuestas de los animales a estímulos dolorosos no eran más que reflejos y que los animales eran autómatas que no sentían ni pensaban en forma racional y consciente.

Schopenhauer (1788-1860) fue uno de los primeros filósofos que argumentó que los animales comparten con nosotros la capacidad de sufrir y la conciencia.

Ya en 1959 Russel y Burch habían publicado su libro “The Principles of Human Experimental Technique”, en el que proponen el principio de las “3 R’s” de la técnica humanitaria: Reemplazar, Reducir y Refinar, conceptos que se han vuelto clásicos en la literatura sobre animales en la experimentación.

Se entiende con el término reemplazar, sustituir a los animales con otros métodos, conocidos como alternativas, en especial cultivo de células, protozoarios, bacterias y modelos de computación.

Reducir se refiere a disminuir el número de animales utilizados en una investigación, lo que se logra por medio de una minuciosa planeación y ejecución del experimento, utilizando animales homogéneos en cuanto a raza o cepa, edad, estado de salud, peso y procedencia.

Con Refinar se entiende la disminución de la frecuencia o de la severidad de procedimientos inhumanos a los que los animales serán expuestos.

La Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación, publicó en el Diario Oficial del Gobierno Mexicano el 28 de junio de 2001 la Norma Oficial Mexicana NOM-062 ZOO-1999: “Especificaciones técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio”. (1)



#### 4.1 CLASIFICACION DE LOS ANIMALES DE LABORATORIO.

##### 4.1.1 Clasificación por el grado de parentesco.

Dependiendo del grado de parentesco que exista entre los animales de una misma colonia, se dividen en cuatro grupos de colonias:

- **No consanguíneas:** también llamados palmíticos. Se usan para producir animales homogéneos con el mismo grado de parentesco. El sistema de acoplamiento se realiza al azar en colonias cerradas, por lo que produce individuos con las mismas reacciones frente a mismos agentes microbianos.
- **Consanguíneas:** Se cruzan hermano con hermana durante 20 generaciones consecutivas. Cada cepa es genéticamente única y tienen gran valor para estudiar el funcionamiento de tumores, pero la cantidad de crías y su viabilidad es menor, debido a que los errores genéticos, al cruzar hermanos, se ven acentuados.
- **Híbridas:** surgen de cruzar dos cepas consanguíneas, por lo que se consigue una mayor viabilidad, más crías y menos enfermedades por lo que comentábamos para el grupo anterior.
- **Transgénicas:** se les modifica el material genético al introducirles una secuencia de ADN ajeno a la especie que se está modificando. (2)

##### 4.1.2 Clasificación microbiológica.

Los animales de laboratorio se clasifican de acuerdo a la presencia o ausencia de microorganismos patógenos. Los patógenos por controlar son parásitos, virus, bacterias y hongos.

##### **Categoría I: animal haloxénico (tradicionalmente convencional).**

Son animales mantenidos sin ningún proceso especial (instalaciones abiertas) tradicionalmente llamados convencionales. Deben estar libres de toda evidencia de enfermedades infecciosas, especialmente las trasmisibles al hombre, tanto en el examen clínico como en el post mórtem. Se refiere a las siguientes entidades biológicas:

- Toda *Salmonella* y *Shigella*.
- *Mycobacterium tuberculosis*.
- *Yersinia pseudotuberculosis*.
- *Leptospira spp.*
- Dermatofitos.
- *Sarcoptes scabiei*.
- Virus de la coriomeningitis linfocitaria (LCM).

##### **Categoría II: animal miroxénico.**

Son comparables a los animales convencionales mantenidos bajo condiciones sanitarias estrictas y estándares. Albergan una fracción inoculada de microorganismos no patógenos tomados de la microbiota de un haloxénico; deben mantener o ser del mismo estatus de la Categoría I y además estar libres de:



- *Listeria monocytogenes*.
- *Bacillus piliformis* (*Clostridium piliformis*).
- Estadios intermedios de céstodos y de artrópodos parásitos obligados.
- Especies determinadas demandan la ausencia de los virus: *Ectromelia* (ratón) y *Myxomatosis* (conejo).

#### **Categoría III: animal gnotobiótico con microbiota definida**

Son comparables a los animales derivados de cesárea (axénicos) a los que se les introduce voluntariamente especies microbianas conocidas. Deben ser del mismo estatus de la Categoría II y además estar libres de:

- *Bordetella bronchiseptica*.
- Toda *Pasteurella*.
- Todas las *Coccidias* (*Eimerias spp*) y helmintos patógenos.

Además, especies determinadas demandan la ausencia de:

- *Streptobacillus moniliformis* (ratones y ratas).
- *Corynebacterium kutscheri* (*C. murium*) (ratones).
- *Streptococcus pneumoniae* (cobayo y conejo).
- Todas las especies de *Mycoplasma* (ratones y ratas).
- *Treponema cuniculi* (sífilis del conejo/conejo)

#### **Categoría IV: animal heteroxénico (libre de gérmenes patógenos, SPF)**

Son comparables a los animales descritos como libres de gérmenes patógenos específicos (*Specific Pathogens Free*, SPF). Estos son derivados de un axénico o gnotobiótico que adquiere una microbiota proveniente de su medio, son mantenidos en zonas protegidas (sistemas cerrados). Deben ser del mismo estatus de la Categoría III y además estar libres de:

- Estreptococos (excepto grupo D).
- Neumococos.
- Helmintos.
- Protozoos patógenos.
- Virus que afectan a estas especies.

Además, especies determinadas demandan la ausencia de:

- Todas las especies de *Mycoplasma* (hamster y cobayo).
- *Fusiformis necrophorus* (conejos).

#### **Categoría V: animal axénico (libre de gérmenes, GF)**

Son animales que no albergan ninguna especie microbiana viviente detectable. Son el resultado del uso de sistemas cerrados estériles y se encuentran libres de todo organismo demostrable (virus, bacterias, hongos, parásitos y organismos saprófitos). Se les conoce como animales *Germ Free* o axénicos, los cuales son derivados por histerotomía (cesárea) o histerectomía aséptica, criados y mantenidos en un aislador mediante técnicas gnotobióticas. Estos animales no siempre se obtienen en la práctica, debido a los agentes transmitidos verticalmente.



Este esquema de clasificación por categorías ha sido sujeto a revisiones regulares y a pesar de algunos cambios menores en cuanto al establecimiento y definición de las entidades microbianas (bacterias, hongos, parásitos y virus) que deben o no estar presentes, según la categoría específica, ha resistido la prueba del tiempo. (3)

### 4.2 ANIMALES USADOS EN LA EXPERIMENTACION

#### 4.2.1 Ratones



Figura 4.1 Ratón

Los ratones de laboratorio cuentan el 60-80% de todos los mamíferos usados como animales de laboratorio. Sus principales usos en el laboratorio se encuentran en pruebas de bioensayo y la toxicidad, la selección de nuevos compuestos, microbiología, virología, radiobiología, la investigación del cáncer (especialmente cepas puras) y la investigación del comportamiento.

Utilizados para la investigación de virus y enfermedades como:

- Fiebre aftosa
- Virus del Herpes simple
- Rabia

#### 4.2.2 Ratas

Después de los ratones, las ratas son los mamíferos de laboratorio más comúnmente utilizados, lo que representa un 10-15% del total. Se utilizan principalmente para los estudios de toxicidad, incluyendo pruebas de largo plazo, porque la investigación nutricional, para la investigación de la conducta, y la investigación del cáncer. Un pequeño número se utiliza en fisiológica, y bastante más farmacológicas, investigaciones y enseñanza. (4)

Se utilizan para la investigación de virus y enfermedades como:

- Fiebre aftosa
- Rabia

#### 4.2.3 Primates no humanos

Cada año se utilizan más de 100.000 monos y simios para investigaciones biomédicas en todo el mundo. Sus similitudes genéticas con los seres humanos los convierten en los candidatos ideales para llevar a cabo pruebas de seguridad de fármacos nuevos, así como para estudiar enfermedades infecciosas o el cerebro. Pero dichas semejanzas también plantean cuestiones éticas sobre su utilización en experimentos científicos.



Figura 4.2 Chimpancé

En la investigación de enfermedades infecciosas, las vacunas y los fármacos que se desarrollan suelen probarse primero en células cultivadas en laboratorio, después en animales y finalmente en seres humanos para comprobar su seguridad y eficacia. A menudo, los primates siguen siendo la mejor opción entre los animales, pues su sistema inmunitario es muy similar al de los seres humanos.

Las especies de primates son las únicas que pueden utilizarse para desarrollar vacunas y fármacos eficaces contra el paludismo, la tuberculosis, la hepatitis C o el VIH en seres humanos. También se necesitan primates para detectar rápidamente enfermedades nuevas como el SARS, que podrían propagarse por todo el mundo. (5)

- Virus de Nipah (VNi) en seres humanos.

#### 4.2.4 Aves

Utilizadas para la investigación de virus y enfermedades como:

- El virus del Nilo Occidental.
- Varicela.
- Parotiditis.
- Síndrome respiratorio agudo severo (SARS).
- Influenza aviar A (H5N1).



Figura 4.3 Pollo

#### 4.2.5 Mosquitos

Usados para la investigación de virus y enfermedades como:

- El virus del Nilo Occidental
- Dengue transmitido por la picadura del mosquito hembra Culicidae (*Aedes aegypti* y *Culex quinquefasciatus*), Blattellidae (*Blattella germanica*), Muscidae (Mosca domestica) y Reduviidae (*Triatoma flavida*).



Figura 4.4 Mosquito *Aedes aegypti*



#### 4.2.6 Equinos y Caprinos

Se utilizan para obtener antisueros y para estudios sobre enfermedades y virus como:

- El virus del Nilo Occidental.
- Virus de Encefalitis Equina Venezolana.



Figura 4.5 Caballo



---

**REFERENCIAS.**

1. Aline S. de Aluja, Animales de laboratorio y la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999) Gac Méd Méx Vol. 138 No. 3, 2002
2. Farmacología: Los diferentes tipos de animales en experimentación (I). Consultado el 27 de Septiembre de 2013. Disponible en <http://www.xatakaciencia.com/biologia/farmacologia-los-diferentes-tipos-de-animales-en-experimentacion-i>
3. Guía de manejo y cuidado de animales de laboratorio: ratón. Ministerio de Salud Instituto Nacional de Salud. Lima 2008.
4. The UFAW handbook on the care and management of laboratory animals.1972. pp 276-326.
5. Primates no humanos en investigaciones y pruebas de seguridad. En Public Health. Consultado el 27 de Septiembre de 2013. Disponible en <http://ec.europa.eu/health/opinions/es/primates-no-humanos/index.htm#1>

**Imágenes.**

Figura 4.1- Recuperado de <http://www.lacienciaysudemonios.com>

Figura 4.2- Recuperado de <http://www.adrformacion.com/cursos/intemo/leccion1/tutorial7.html>

Figura 4.3- Recuperado de <http://fotoblogx.blogspot.mx/2011/09/aves-hermosas-imagenes-de-aves-en-alta.html>

Figura 4.4- Recuperado de <http://micubitas.wordpress.com/2011/12/15/continua-sierra-de-cubitas-en-la-erradicacion-del-mosquito-aedes-aegypti/>

Figura 4.5- Recuperado de <http://www.taringa.net/posts/imagenes/16527450/Viernes-de-siluetas-Tutorial-Fotografia-de-Siluetas.html?dr>

5.

## PRUEBAS SEROLÓGICAS



## 5. PRUEBAS SEROLÓGICAS

### ANTECEDENTE HISTORICO

Cuando determinadas sustancias penetran el cuerpo, los tejidos responden con la formación de inmunoglobulinas. Dichas inmunoglobulinas se denominan “anticuerpos” (Ac) y tienen la capacidad de unirse en forma específica con las sustancias denominadas “antígenos” (Ag), que dieron lugar a su formación. Los antígenos completos son moléculas grandes, generalmente proteicas. Existen unidades más pequeñas (haptenos) se pueden combinar con las proteínas para formar los antígenos completos. Las características de los anticuerpos se resumen en el cuadro 5.1.

Las reacciones antígeno-anticuerpo son altamente específicas. Un anticuerpo reacciona únicamente con la especie antigénica que originó su formación o uno muy cercano que esté relacionado con él.

**Cuadro 5.1 Algunas características de las inmunoglobulinas (Ig).**

	IgG	IgM	IgA	IgD	IgE
Coefficiente de sedimentación	7S	19S	7S u 11S*	7S	8S
Peso molecular	150,000	900,000	170,000 ó 400,000	180,000	190,000
Simbología de cadena pesada	Γ	μ	A	δ	E
Concentración promedio en suero normal (mg/100ml)	1,000-1,500	60-180	100-400	3-5	0.03
Vida media en el suero (días)	23	5	6	3	2.5
Prominente en las secreciones externas	-	-	++	-	+
Porcentaje de carbohidratos	4	15	10	18	18
Atraviesa la placenta	+	-	-	?	-
Fija el complemento	+	+	-	-	-
Ejemplos de anticuerpos	Muchos anticuerpos a toxinas, bacterias, virus, especialmente al final de la respuesta Ac	Muchos anticuerpos contra agentes infecciosos, en especial al principio de la reacción Ac, anti polisacárido, aglutininas frías.	Importantes como anticuerpos secretorios sobre mucosas	No hay actividad Ac presente sobre la superficie de los linfocitos en el recién nacimientos linfática.	Sensibiliza piel en tejidos en la alergia; reagina; se fija a las células cebadas y basófilos. Elevada en la alergia.



### Momento en que se debe tomar la muestra

Para obtener resultados fehacientes sobre una posible enfermedad infecciosa, debe obtenerse siempre una muestra de suero tan pronto como sea posible, otra muestra dos semanas después y una tercera alrededor de la cuarta semana después de la instalación del padecimiento.

### Interpretación de los resultados

Si se encuentran anticuerpos a la misma concentración (título) en las muestras sistemáticas, prácticamente se puede tener la certeza de que fueron adquiridos en el pasado y no están relacionados con enfermedad actual. En caso de que su concentración aumente notablemente en el curso de una enfermedad (por ejemplo, de la muestra inicial a una posterior), ayudará a establecer la situación importante del antígeno que reacciona con el anticuerpo sérico. De manera opuesta, la detección de un aumento o disminución de la concentración de un antígeno puede tener significado en el diagnóstico pronóstico. (1)

## 5.1 FIJACION DE COMPLEMENTO (FC)

### Antecedentes históricos

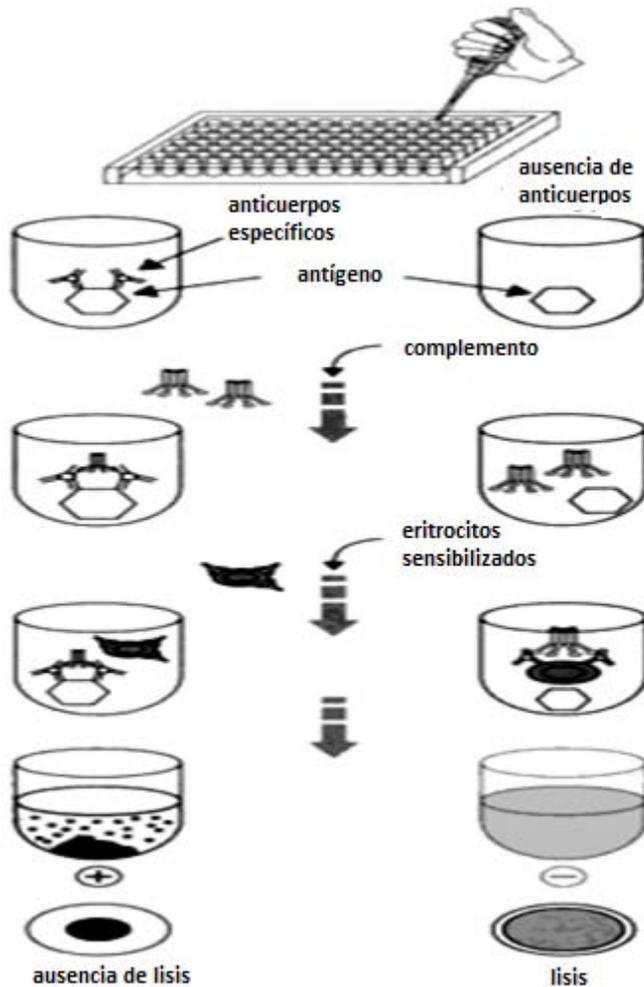
La reacción de fijación del complemento (antes “alexina”) descrita por Bordet (fenómeno de Bordet, o fenómeno de Bordet-Gengou) dio lugar a numerosos trabajos de investigación; se abrió un nuevo campo, el del serodiagnóstico, mediante el cual se buscaban determinados anticuerpos en el suero de un enfermo por medio de una reacción de aglutinación. Los trabajos en serodiagnóstico tuvieron sus resultados positivos para el diagnóstico de la fiebre tifoidea. Wassermann los empleó para investigar y descubrir el agente responsable de la sífilis.

### Fundamento

Las pruebas de fijación de complemento tienen un amplio uso en el diagnóstico de enfermedades virales y micóticas, así como en otras enfermedades. Se realizan en dos etapas. En la primera, el antígeno y el anticuerpo (uno conocido y el otro desconocido) reaccionan en presencia de una cantidad de complemento conocido. Si el antígeno y el el Ac se unen, el complemento se consume. En la segunda etapa, se prueba la actividad hemolítica del complemento residual (si este existe) por medio de la adición de eritrocitos y anticuerpos antieritrocitos de complemento libre. La cantidad de hemólisis se mide para determinar la cantidad de complemento que no se consumió en la primera etapa. (1)

### Procedimiento

El procedimiento para llevar a cabo la prueba de fijación del complementose resume en la figura 5.1



- Dilución del suero.
- Adición del antígeno.
- Adición del complemento.
- Adición de eritrocitos sensibilizados.

Figura 5.1 Procedimiento fijación de complemento.

1. En un principio el antígeno reacciona con anticuerpo que se encuentra en la muestra de suero del paciente y en presencia de complemento, titulado previamente.
2. Si el antígeno y el anticuerpo reaccionan se activa la vía clásica del complemento.
3. Seguidamente se añade el indicador constituido por eritrocitos cubiertos con anticuerpos y de esta forma, si el complemento se fija y es activado por el complejo antígeno - anticuerpo, los eritrocitos no se lisan; pero si no hay unión antígeno - anticuerpo, el complemento permanece libre y se une al complejo indicador y produce lisis de los eritrocitos.

### Usos en el área de virología

Una de sus aplicaciones consiste en determinar anticuerpos contra agentes de baja prevalencia como los virus coxsackie, o también para determinar la actividad de ciertas infecciones como por ejemplo la rubéola. (2)



## 5.2 AGLUTINACION EN LATEX

### Fundamento

Las partículas de látex son esferas de poliestireno que se unen fácilmente al fragmento cristalizable (Fc) de moléculas de inmunoglobulina G (IgG) o inmunoglobulina M (IgM), esta última es mucho más eficiente en aglutinar partículas naturales. Los fragmentos de unión del anticuerpo (FAb) quedan expuestos y son capaces de unirse al antígeno que se encuentra en la muestra. Cuando los antígenos tienen varios epítopos (o estructuras antigénicas repetitivas), los anticuerpos multivalentes acoplados a múltiples partículas de látex se unen al antígeno y se produce un entramado de las partículas de látex que dan como resultado una aglutinación visible. (2)

En las reacciones de aglutinación las partículas se agrupan. En algunas de estas reacciones detectan anticuerpos contra antígenos conocidos:

- **Aglutinación directa:** La prueba de aglutinación directa se usa para detectar anticuerpos contra una variedad de suspensiones bacterianas, que comprenden Salmonella, Brucella, Yersinia, Leptospiras, Proteus, y otras especies. Los cálculos cuantitativos de las concentraciones de anticuerpos (títulos), pueden obtenerse mediante pruebas de dilución seriadas en suero. En las enfermedades infecciosas y otras, un cambio mayor en los títulos de anticuerpos da información más importante que las que dan títulos de una sola determinación.
- **Aglutinación indirecta (pasiva):** la prueba aglutinación indirecta se usa para detectar anticuerpos contra una gran variedad de antígenos solubles. Algunos de estos antígenos absorban de manera espontánea, partículas de látex o eritrocitos no tratados (por ejemplo, toxinas bacterianas, proteínas, algunos virus y antígenos solubles de bacterias). Para otros antígenos, los eritrocitos se tratan con ácido tánico, glutaraldehídos u otros productos químicos que permiten el enlace. (1)

### 5.2.1 HEMAGLUTINACIÓN VIRAL (HA)

#### Antecedentes históricos

Este fenómeno fue descrito por primera vez por Hirst en 1941, quien observó en un embrión de pollo la aglutinación de glóbulos rojos en un vaso sanguíneo roto, mientras realizaba pases de virus de influenza en el líquido alantoideo. Hirst reconoció la importancia de este hallazgo y describió la hemaglutinación como un método para ensayo de virus. (3)

#### Fundamento

Hemaglutinación es la propiedad que tienen ciertos virus para unir y aglutinar eritrocitos de mamíferos y aves debido a las proteínas que poseen en su capa externa. Esta hemaglutinación inducida por virus puede usarse para facilitar la identificación de un virus desconocido.

La actividad enzimática de las proteínas virales produce hemaglutinación en la cual los eritrocitos se unen por medio de puentes. Se ha demostrado que el glóbulo rojo contiene cerca de 300 sitios



en los cuales se puede adsorber un virus. Muchos virus contienen proteínas en su capa externa que los capacitan para aglutinar glóbulos rojos de varias especies.

### Virus hemaglutinantes

Son microorganismos hemaglutinantes los ortomixovirus y paramixovirus, alfavirus, flavivirus y bunyavirus, así como algunos adenovirus, reovirus, parvovirus y coronavirus.

En el cuadro 5.2 se muestran algunos virus hemaglutinantes y el tipo de eritrocitos que se necesitan en la prueba de hemaglutinación.

**Cuadro 5.2 Ejemplos de virus hemaglutinantes.**

Familia	Género o especie	Eritrocitos
Adenoviridae	La mayoría de las especies	Mono y /o rata, 37° C
Poxviridae	Ortopoxvirus	Embrión de pollo 37°
Parvoviridae	La mayoría de las especies	Cobayo, hamster, cerdo, humano, mono, 4° C
Togaviridae	Alfavirus	Ganso, paloma, pollo; pH y temperatura críticas
Flaviviridae	Flavivirus	Ganso, paloma, pollo; pH y temperatura críticas
Orthomyxoviridae	Influenza A	Pollo, humano, cobayo, 4° C
Paramixoviridae	Parainfluenza, Enfermedad de Newcastle	Pollo, humano, cobayo, 4° C
Coronaviridae	Varias especies	Rata, ratón, pollo
Bunyaviridae	Varias especies	Ganso; pH crítico
Reoviridae	Reovirus Rotavirus	Humano

(3)

### Procedimiento

- Colocar una gota de PBS.
- Colocar una gota de la suspensión viral.
- Hacer diluciones dobles en proporciones constantes con un microdiluidor de 0,05 ml., a partir del segundo orificio hasta el penúltimo.
- Agregar glóbulos rojos de bovino, lavados y diluidos.
- Mezclar con cuidadoso balanceo, dejar a 4° C, leer.

Algunos virus tienen la capacidad de aglutinar o formar una malla de eritrocitos a su alrededor cuando las partículas virales están en una concentración suficientemente alta. Los eritrocitos aglutinados pueden distinguirse fácilmente de las células no aglutinadas: los eritrocitos que no están aglutinados se desplaza libremente hacia el fondo de pocillo y forman allí un botón denso, fácil de identificar. Los eritrocitos aglutinados no pueden desplazarse libremente y dan lugar a una cubierta uniforme en el fondo de la celdilla (figura 5.2 y 5.3). (4)



Figura 5.2 Vista lateral de los pocillos

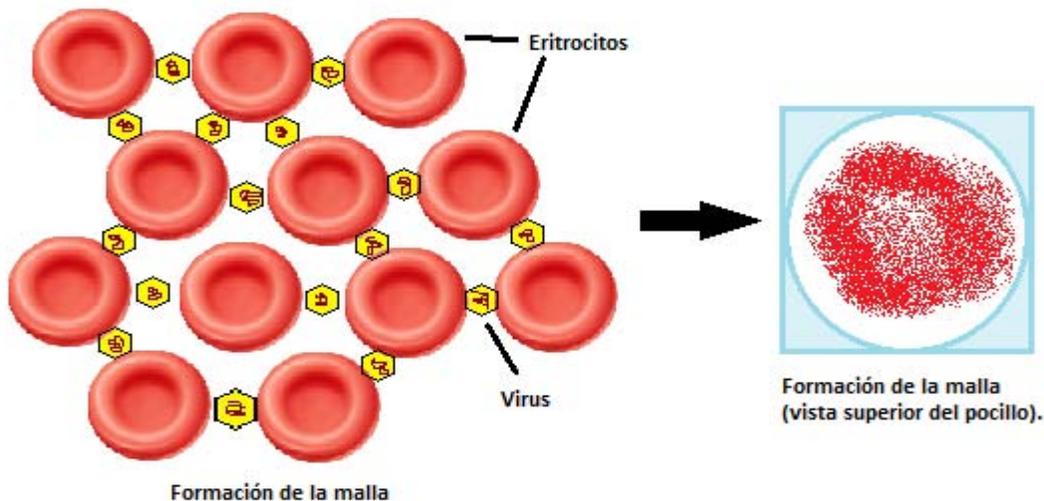


Figura 5.3 Prueba de hemaglutinación.

### Usos en el área de virología

La técnica de hemaglutinación se utiliza para:

- El diagnóstico para la identificación de un virus aislado.
- Sirve para titular partículas virales activas o inactivas en una suspensión.
- Permite purificar y concentrar virus.
- En investigación es de gran importancia biológica en la unión de los virus a células hospedadoras, su liberación y posibles mecanismos de infección.
- La prueba en placa permite determinar la presencia de virus hemaglutinantes en el líquido infectado. (3)

### 5.2.2 INHIBICIÓN DE LA HEMAGLUTINACIÓN (IHA)

#### Fundamento

Es una prueba que deriva de la habilidad de algunos virus de adherirse a receptores de eritrocitos y aglutinarlos (hemaglutinación). Sin embargo la interacción es impedida por anticuerpos específicos en el suero del paciente evitando la aglutinación de los eritrocitos por tales antígenos; los antígenos implicados en esta reacción son los componentes de la superficie de la partícula viral, los cuales poseen determinantes antigénicos más específicos de tipo. Esta prueba



de la inhibición de la hemaglutinación es un medio altamente específico para la caracterización de los virus. (2)

### Procedimiento

Para realizar la prueba se hacen diversas diluciones del suero con el fin de hacer una titulación y determinar el nivel de anticuerpos del paciente.

Esto se demuestra haciendo reaccionar la mezcla de antígeno con anticuerpo (suero del paciente) con glóbulos rojos, los que no se unen y sedimentan formando un botón o punto en ausencia del anticuerpo específico se expresa la propiedad hemoaglutinante del virus, que se visualiza por la formación de una malla de aglutinación en el tubo o pocillo en que se realiza la reacción (Ver figura 5.4). (2)

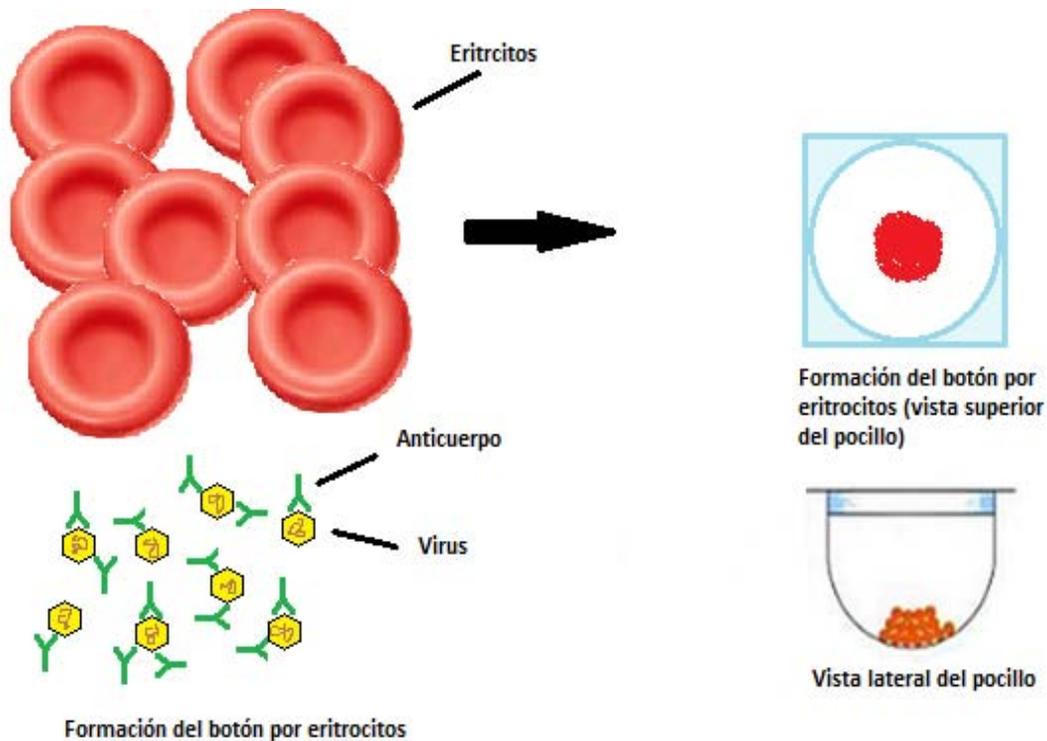


Figura 5.4 Inhibición de la hemaglutinación.

### Usos en el área de virología

Las pruebas de IHA constituyen métodos de diagnóstico e investigación sencillos y útiles en la:

- Identificación de virus.
- Determinación de la relación antigénica entre virus aislados.
- Identificación y cuantificación de anticuerpos contra virus. (3)



La reacción constituye la base para numerosas pruebas diagnósticas, las enfermedades en la que se puede demostrar la respuesta de anticuerpos por la prueba de IHA son: Influenza, Enfermedad de Newcastle, Rubéola, Sarampión, Dengue, infecciones por reovirus, etc. (2)

### 5.3 NEUTRALIZACIÓN VIRAL

#### Fundamento

La neutralización viral (o reacción de neutralización) se basa en la pérdida de la capacidad infectiva de un virus al unirse al anticuerpo específico, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Demuestra anticuerpos por su efecto inhibitorio en la infectividad viral. (Ver figura 5.5 y 5.6) (5)

#### Procedimiento

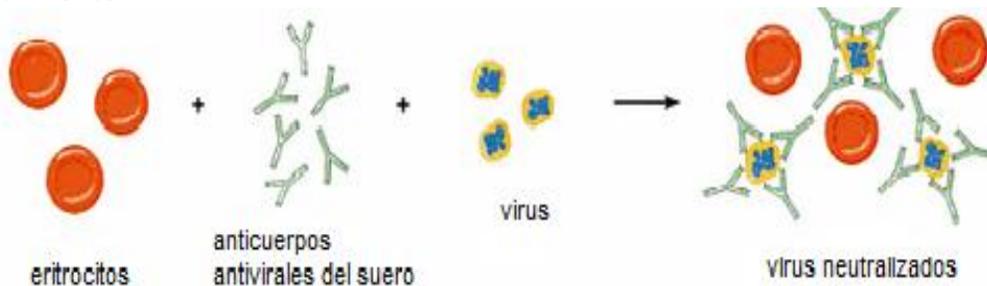


Figura 5.5 Neutralización viral.

Este ensayo mide funciones virales específicas, por lo que es bastante selectivo, de esta forma la neutralización viral sólo mide anticuerpos para antígenos específicos sobre la superficie viral. Si los anticuerpos se encuentran en el suero del paciente que se pone a incubar con una suspensión del virus, los anticuerpos reaccionarán con los antígenos virales y cuando la suspensión se ponga en presencia de las células permisivas al virus (en cultivo celular) el resultado será la neutralización de la invasión celular y la no evidencia del efecto citopático (Ver figura 5.6). (5)

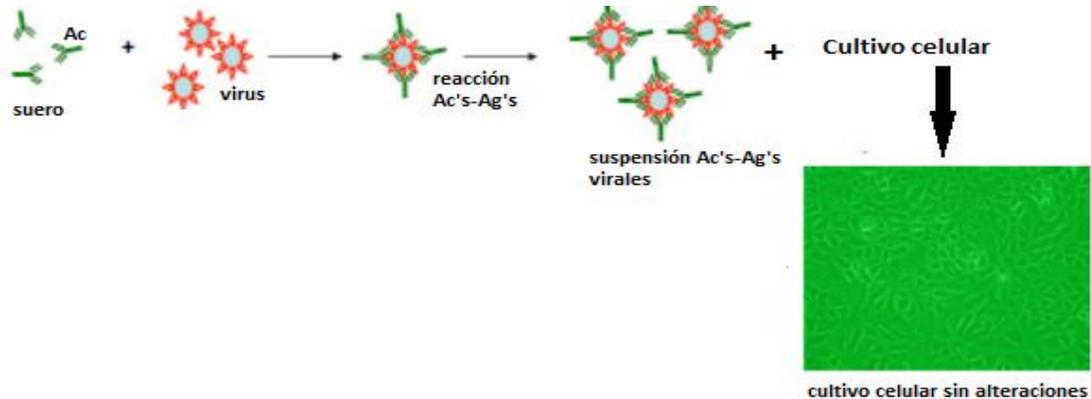


Figura 5.6 Neutralización viral en medio de cultivo.



### Usos en el área de virología

Esta técnica se ha utilizado para el diagnóstico de las infecciones por varios virus entre ellos dengue. (5)

## 5.4 RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA)

### Antecedentes históricos

A finales de los 50 y principios de los 60 R. S. Yalow y S. A. Berson establecieron los fundamentos del triunfal advenimiento de los inmunoensayos cuantitativos con el desarrollo del radioinmunoensayo.

Durante una investigación sobre el metabolismo de la insulina utilizando insulina de cerdo marcada con  $I^{131}$ , ambos descubrieron la unión de esta insulina porcina a anticuerpos de muestras de plasma humano. Estos anticuerpos fueron detectables sólo en sujetos que utilizaban la insulina del cerdo de manera regular con fines terapéuticos. Pasaron varios años antes de que se describiera el comportamiento competitivo de la insulina marcada y no marcada sobre los sitios de unión de anticuerpos anti-insulina de las muestras de plasma y antes de que se inventara el primer radioinmunoensayo de determinación de insulina humana en muestras de plasma. Este grandioso trabajo realizado por R. S. Yalow mereció la concesión del Premio Nobel de Fisiología y Medicina en 1977. (6)

### Fundamento

Los radioinmunoanálisis son los métodos más sensibles y versátiles para la cuantificación de antígenos o haptenos y que pueda marcarse con radiactividad. En particular en radioinmunoanálisis puede aplicarse a la determinación de concentraciones séricas de muchas hormonas, medicamentos y otros materiales biológicos. El método se basa en la competencia por un anticuerpo específico entre la concentración marcada (conocida) y la no marcada (desconocida) del material. Los complejos que se forman entre el antígeno (o hapteno) y el anticuerpo se pueden separar entonces determinándose la cantidad de radiactividad. La concentración del antígeno desconocido (sin marcar) se determina por comparación con el efecto de los estándares. (1)  
(Ver figura 5.7).

### Procedimiento

## RIA (Radioimmunoassay) (Radioinmunoensayo directo)

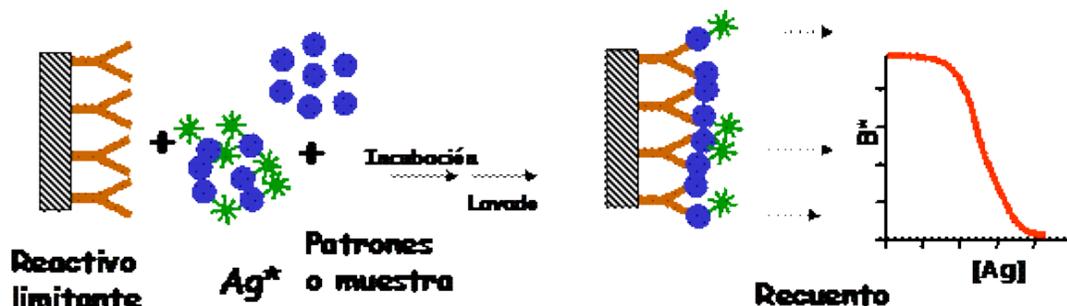


Figura 5.7 Radioinmunoensayo



1. Al sistema de fijación elegido se le agrega una cantidad  $x$  de antígeno marcado.
2. Posteriormente se le agrega una cantidad  $x$  de antígeno sin marcar o sea el suero problema, así se establece la competencia por los sitios de unión del anticuerpo.
3. Sigue la incubación a  $37^{\circ}$  C, procediendo a los lavados mediante los cuales se realiza la separación del antígeno unido y del libre.
4. De la cantidad de antígeno marcado fijado a diferentes concentraciones se hace una curva que permite encontrar cualquier concentración de antígeno no marcado que sea desconocido. (7)

## 5.5 INMUNOFLUORESCENCIA Y CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA (FACS)

### Antecedentes históricos

En la década de 1930 existía mucho interés por el estudio de las proteínas. Simultáneamente se estaba trabajando en la combinación de algunas proteínas séricas; entre otras, la posibilidad de combinar antisueros con colorantes y que los antisueros no perdiesen la propiedad específica de anticuerpos. En 1934 J. Marrack, en la revista "Nature", por primera vez plantea la posibilidad de aplicar esta técnica con un método que no resultó sensible, pero en su libro "La química de los antígenos y los anticuerpos", explica sus estudios de muchos años y a su vez, en forma rudimentaria explica su teoría ("Lattice theory") de la reacción antígeno-anticuerpo, todavía vigente y que contribuyó a sentar las bases científicas sobre este tipo de reacción. Coons, Creech, Jones y Berliner en 1942 plantearon una solución al concebir que era necesario mejorar la sensibilidad óptica iluminando el espécimen con luz ultravioleta invisible y marcando el anticuerpo con un colorante fluorescente.

El colorante se podría detectar más fácilmente, puesto que la luz fluorescente en el tejido no contrastaría con cualquier luz visible que se transmitiese. Coons y sus colaboradores demostraron que esto era posible al conjugar el antisuero a la fluoresceína que producía un color amarillo verdoso, que se podía distinguir del azul autofluorescente de los tejidos. Coons utilizó antígeno de pneumococo marcado con fluoresceína. De esta forma se estableció la técnica de la "inmunofluorescencia" que ofrece la posibilidad de observar en el microscopio la localización del antígeno en los tejidos o en los frotis.

En la década de 1940 se inicia la implementación de las técnicas:

**1. La inmunofluorescencia directa.** Desarrollada por Coons y su equipo en la cual la globulina utilizada se combina con el fluorocromo y el conjugado se aplica directamente al tejido. Este método fue perdiendo importancia por lo siguiente:

- a. Es el menos utilizado.
- b. Es el menos seguro.
- c. Es el menos sensible.



- d. Es difícil de controlar.
- e. Es necesario realizar la conjugación del suero de los pacientes en forma individual, lo que lo hace demasiado tedioso.

**2. La inmunofluorescencia indirecta.** Es la que más se utiliza y fue implementada por TH Weller y AH. Coons en 1954. El tejido que se va a utilizar es tratado con el suero del paciente al que se le une un suero con una antiinmunoglobulina marcada con fluoresceína llamada conjugado. Este método es:

- a. Más seguro.
- b. Más versátil.
- c. Fácil de controlar.
- d. El conjugado que se utiliza es una globulina antihumana que se puede utilizar con el suero de muchos pacientes. (8)

### Fundamento

La fluorescencia es un fenómeno instantáneo que se define como la propiedad de ciertas sustancias para emitir una radiación de espectro visible cuando se les ilumina con una radiación de longitud de onda más corta, como el azul o el violeta.

La reacción entre un antígeno y un anticuerpo se puede hacer visible, gracias a la incorporación de un colorante fluorescente (fluoresceína o rodamina) en el anticuerpo, sin que cause modificación alguna en las propiedades de reconocimiento específico de éste. Tal efecto se logra mediante iluminación con luz ultravioleta en un campo oscuro, donde en los compuestos fluorescentes se puede distinguir la marca; sin embargo, si se prolonga la exposición a la longitud de onda de luz excitadora disminuye la intensidad de la fluorescencia.

Por medio de esta técnica es posible detectar cualquier antígeno en cortes de tejidos fijos o en suspensiones celulares vivas. Los anticuerpos que se utilizan deben ser altamente puros, ya que esto aumenta la eficiencia de la coloración y evita resultados inespecíficos.

De manera general, esta técnica incluye varias etapas:

- Preparación de los antisueros.
- Conjugación de los antisueros con la sustancia fluorescente.
- Procedimiento de la tinción.

Existen tres variantes de inmunofluorescencia:

- **Inmunofluorescencia directa.** El anticuerpo conjugado con el fluorocromo reacciona directamente con el tejido.
- **Inmunofluorescencia indirecta.** Es un método de doble anticuerpo, en el cual el primer anticuerpo contra las células no está macado, por lo que se añade un segundo anticuerpo, marcado con el compuesto fluorescente. Este anti-anticuerpo se dirige contra el primero.
- **Inmunofluorescencia cuantitativa.** Mide de forma precisa la cantidad de luz emitida por una muestra fluorescente. En este proceso se utiliza un microfluorómetro. (9)



### Procedimiento

1. Las muestras clínicas apropiadas son recolectadas y colocadas sobre portaobjetos donde se dejan secar y fijar.
2. Luego se agregan anticuerpos específicos marcados con isotiocianato de fluoresceína que difunden a través de la membrana celular y se combinan con los antígenos víricos en el interior de las células.
3. La reacción antígeno anticuerpo se visualiza con el microscopio de fluorescencia, por la aparición de fluorescencia de color verde manzana. (2) (Ver figura 5.8 y 5.9)

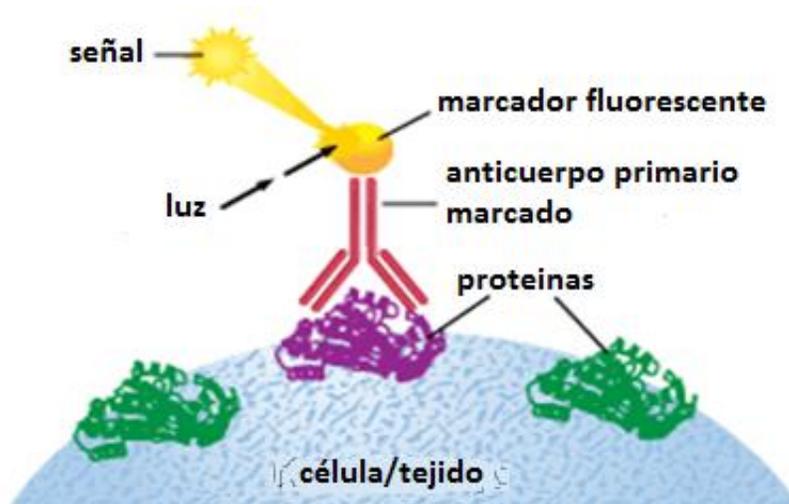


Figura 5.8 Inmunofluorescencia directa.

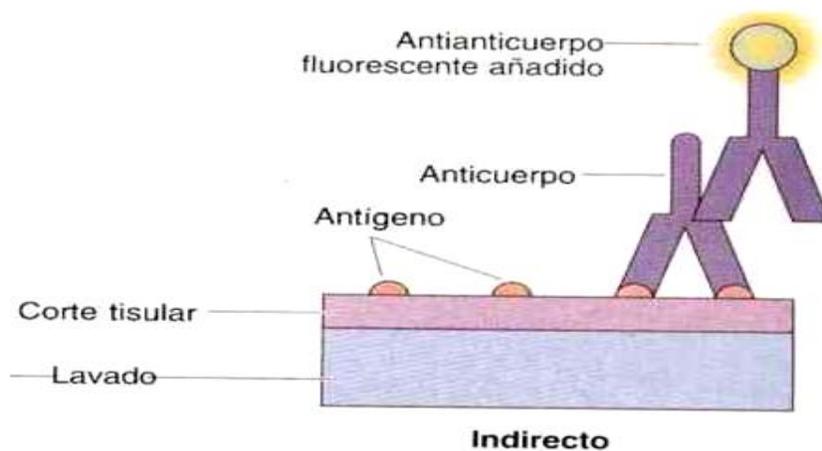


Figura 5.9 Inmunofluorescencia indirecta.



Cuadro 5.3 Fluorocromos más utilizados.

Fluorocromo	Longitud de onda de absorción (nm).	Longitud de onda de emisión (nm).
Cascade blue	374-403	422-430
Fluoresceína (FITC)	494	520
Rodamina (TRITC)	540	570
Naranja de acridina	460-502	526-650
Yoduro de propidio	536	617

(10)

### Usos en el área de virología

Esta técnica se puede utilizar para una identificación rápida del virus directamente sobre la muestra (por ejemplo: células eluidas de un lavado nasal, o de un hisopado nasofaríngeo), o se puede emplear para la confirmación del efecto citopático observado en cultivos celulares.

Además con el uso de anticuerpos monoclonales específicos para los antígenos tempranos inmediatos del Citomegalovirus (CMV) es posible determinar la presencia del CMV en cultivos celulares días antes del reconocimiento del efecto citopático.

El método, en manos de una persona con experiencia resulta útil para la identificación rápida de ciertos virus como los virus respiratorios, ya que nos proporciona un diagnóstico etiológico en el curso de una jornada de trabajo. Además puede estudiar varias muestras simultáneamente. El advenimiento de los anticuerpos monoclonales, ha incrementado la especificidad y en algunos casos la sensibilidad de estos ensayos. Los anticuerpos monoclonales conjugados con isotiocianato de fluoresceína pueden utilizarse para identificar el virus Respiratorio Sincicial (VRS), Influenza A y B, Para influenza 1,2 y 3 y Adenovirus entre otros, así como para subtipificar especies virales como, por ejemplo, virus Herpes Simple (HSV) de tipo 1 y 2. Esta técnica requiere sólo 2-4hs, y se ha reportado una sensibilidad del 70-80 % comparada con cultivos celulares para la identificación de virus Herpes Simple, 80-95% para VRS y 71% para Influenza A. (2)

## CLASIFICACIÓN DE CÉLULAS ACTIVADAS POR FLUORESCENCIA (FACS)

### Antecedentes históricos

El FACS nació en el laboratorio de L.A. Herzenberg en 1968, se le llamó así por primera vez en 1972, y se basó en las técnicas de separación de Sweet y en el sistema de flujo coaxial de Crossland-Taylor.

El láser se introdujo al FACS después de los resultados de Van Dilla et.al. en 1969, además se introdujeron medidas ópticas en el flujo del sorteo en vez de en el flujo celular y en 1972 se añadió un canal para la dispersión de la luz del láser que hizo posible la detección de células no fluorescentes y que ha servido para medir el tamaño de la célula y para discriminar entre vivas y muertas.



Originalmente, el FACS medía sólo un tipo de fluorescencia pero conforme se desarrollaron nuevos fluoróforos y se mejoró la producción de anticuerpos monoclonales, se abrieron nuevas perspectivas en cuanto a la capacidad de detección del aparato. En el laboratorio de Herzenberg, la capacidad de acoplar los anticuerpos monoclonales a diferentes fluoróforos generó la inquietud de hacer análisis multicolores por lo que se adaptó el aparato para poder hacer lecturas de dos diferentes espectros de emisión a partir de un mismo rayo láser. La aparición de mejores monoclonales y mejores fluoróforos estimuló el desarrollo del FACS de doble láser ya que se volvió interesante aumentar el número de marcadores que podían medirse simultáneamente en una sólo célula. Actualmente, los FACS de un sólo láser se utilizan para medir tres diferentes anticuerpos marcados con diferentes fluoróforos y los FACS de doble láser se usan para medir hasta 5 colores de fluorescencia al mismo tiempo. Además, el mismo grupo, desarrolló recientemente un aparato con tres láseres que permite la medición simultánea de hasta 11 colores de fluorescencia. (11)

### Fundamento

FACS es una modificación de la citometría de flujo, técnica en la cual una suspensión de células sale de un microtubulo en forma de gotitas que no contienen más de una célula cada una. Un haz de laser impacta sobre cada gota (con cada célula) y luego es recibido por un detector que determina ciertas características, por ejemplo el tamaño. Si las células poseen marcadores inmunofluorescentes para identificarlas como linfocitos T CD4 o CD8 el detector puede medir su fluorescencia. Cuando el haz de laser detecta una célula de un tamaño o una fluorescencia preseleccionados, le imparte una carga eléctrica, positiva o negativa. Cuando la gota con carga eléctrica cae entre placas que también poseen carga eléctrica es atraída hacia un tubo receptor o hacia otro, lo que permite separar de manera eficaz las células de diferentes tipos. Con este proceso pueden separarse millones de células en una hora, todas en condiciones estériles, lo que posibilita su empleo en un trabajo experimental. (12)

### Procedimiento

El procedimiento de la técnica de FACS se esquematiza en la figura 5.10.

1. Una suspensión celular se inyecta al flujo laminar donde las células pasan una después de la otra a través de un capilar y llegan hasta un rayo láser.
2. Cuando este rayo incide en una célula, la luz de excitación sale hacia delante y hacia los lados de la célula y esto genera información.
3. La luz dispersada hacia delante provee información sobre el tamaño de la célula. La luz dispersada hacia los lados provee información sobre la granularidad, tamaño y morfología celular.
4. Si la célula va marcada con un fluoróforo, la luz fluorescente se procesa, a través del fotomultiplicador, en el sistema procesador de datos y los resultados son analizados por el software del citómetro.
5. El FACS posee una unidad de “sorteo” que ofrece la posibilidad de separar subpoblaciones seleccionadas. Las células se cargan eléctricamente y las gotas resultantes se desvían al pasar a través de un campo eléctrico. (11)

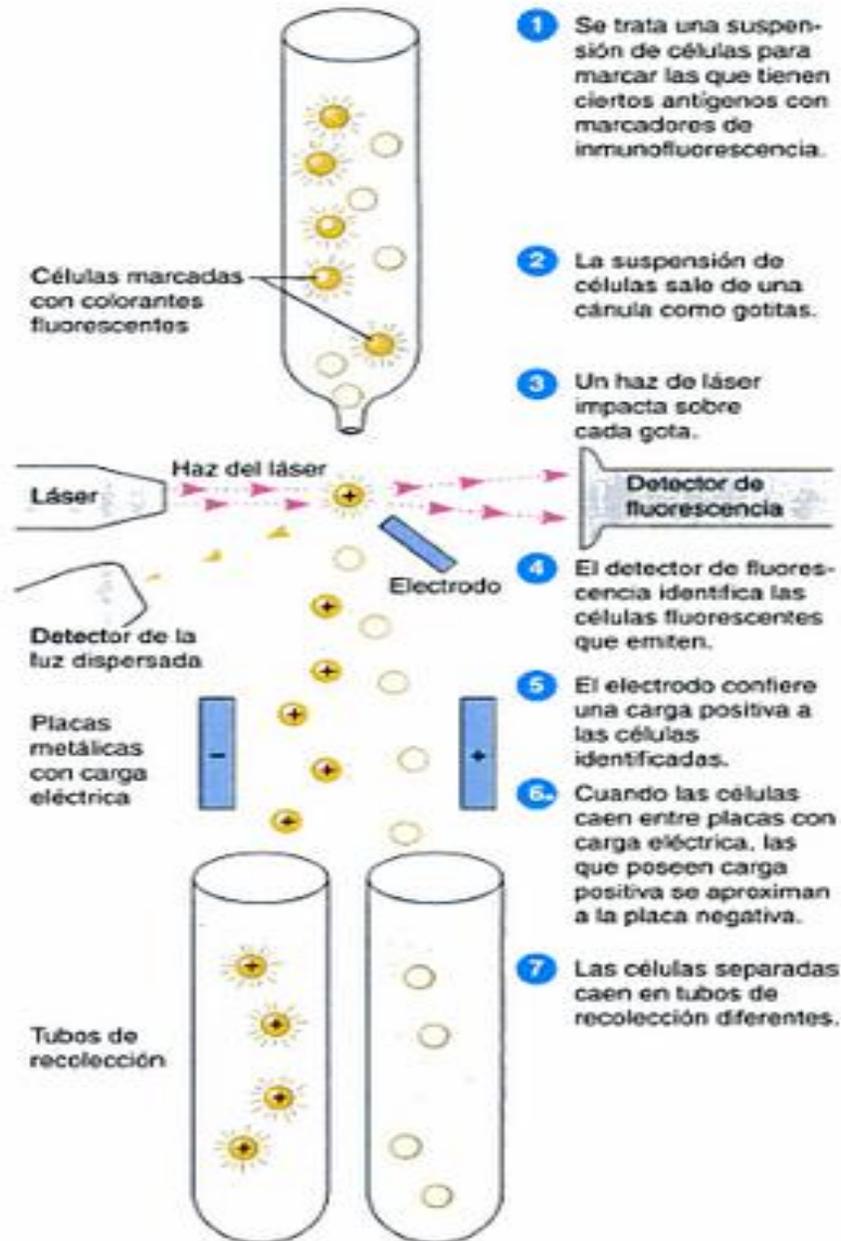


Figura 5.10 Citometría de flujo.

### Aplicaciones

El FACS se ha vuelto una herramienta en la inmunología, farmacología, la toxicología, la bacteriología, virología, ciencias ambientales y en el monitoreo de bioprocesos. A través de la dispersión de la luz, la fluorescencia y la absorbancia de las células teñidas o no teñidas, se pueden medir un gran número de parámetros celulares. (11)



## 5.6 ELISA Y WESTERNBLOT (WB)

### ELISA

#### Antecedentes históricos

El nombre Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, luego abreviado como ELISA, fue acuñado por los investigadores suecos Eva Engvall y Peter Perlmann, quienes describieron el procedimiento publicado en 1971.

El mismo año el procedimiento era objeto de otro artículo de los holandeses Bauke Klaas Van Weemen y Antonius HWM Schuurs, inmunoensayo usando conjugados antígeno-enzima. Voller y Bidwell introdujeron el uso de microplacas de 96 pocillos. <sup>(13)</sup>

#### Fundamento

El ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro. <sup>(14)</sup>

#### Procedimiento

En el cuadro 5.4 se muestran los diferentes tipos de ELISA y su procedimiento general.

1. Se tapiza la placa con el antígeno o anticuerpo específico frente al antígeno a determinar.
2. Se realiza la adición de la muestra problema con la mezcla de antígenos o anticuerpos.
3. Unión del antígeno o anticuerpo específico al anticuerpo o antígeno tapizado en el pocillo.
4. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de anticuerpo o antígeno no unido.
5. Adición del anticuerpo secundario marcado con la enzima
6. Unión del anticuerpo secundario al antígeno o anticuerpo
7. Lavado del pocillo para eliminar el exceso de enzima no unida
8. Adición del sustrato
9. Unión del sustrato a la enzima
10. Desarrollo del color. Cuando el sustrato-enzima no desarrollan un color debe adicionarse un cromógeno.
11. Este producto es cuantificado mediante el lector de ELISA. <sup>(15)</sup>

En la figura 5.11 se esquematizan las reacciones Ag-Ac en los diferentes tipos de ELISA.



Cuadro 5.4 Tipos de ELISA

Pasos	ELISA directo	ELISA indirecto	ELISA en sándwich
Recubrimiento de los pozos con:	Antígeno	Antígeno	Anticuerpo
Lavado con regulador fisiológico	3 veces	3 veces	3 veces
Bloqueo	+	+	+
Incubación con	Ac-enzima	Suero problema	Antígeno problema
Lavado con regulador fisiológico	4 veces	3 veces	3 veces
Incubación con	-	Ac-enzima	Ac-enzima
Lavado con regulador fisiológico	-	4 veces	4 veces
Adición de sustrato (+ cromógeno)	+	+	+
Detección de la reacción	+	+	+
Lectura en la longitud apropiada	+	+	+

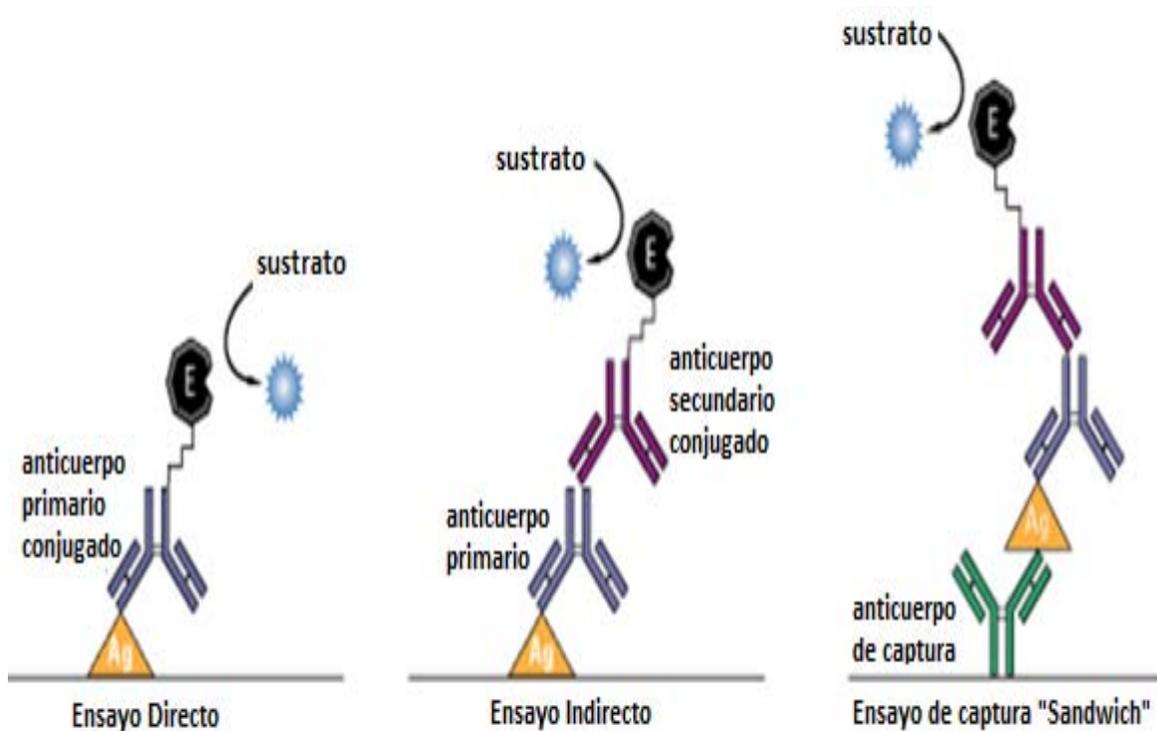


Figura 5.11 Tipos de ELISA



## Aplicaciones

- Virus de Epstein-Barr.
- Paperas.
- Herpes simplex tipo 1 y 2.
- Varicela zoster.
- Hantavirus.
- Sarampión.
- Hepatitis C.
- VIH.
- Rubeola (IgM).
- Rotavirus.
- Enfermedad de Aujeszky.
- Enfermedad de Newcastle.
- Fiebre aftosa.
- Leucemia felina.
- Peste porcina africana y clásica.
- Rinotraqueitis infecciosa.
- Influenza aviar.

## WESTERN BLOT

### Antecedentes históricos

El Western blot fue desarrollado en el laboratorio de George Stark, en la Universidad de Stanford. El nombre (Western, occidental en inglés) le fue dado por W. Neal Burnette, y consiste en un juego de palabras con una técnica análoga pero que usa DNA, el Southern (sureño) blot, que en este caso debe su nombre a su descubridor, Edwin Southern.

### Fundamento

Es una técnica analítica usada para detectar proteínas específicas en una muestra determinada. Mediante una electroforesis en gel se separan las proteínas atendiendo al criterio que se desee: peso molecular, estructura, hidrofobicidad, etc. Luego son transferidas a una membrana adsorbente (típicamente de nitrocelulosa o de PVDF o Nylon) para poder buscar la proteína de interés con anticuerpos específicos contra ella. Finalmente, se detecta la unión antígeno-anticuerpo por actividad enzimática, fluorescencia, etc. <sup>(16)</sup> (Ver figura 5.12)



### Procedimiento

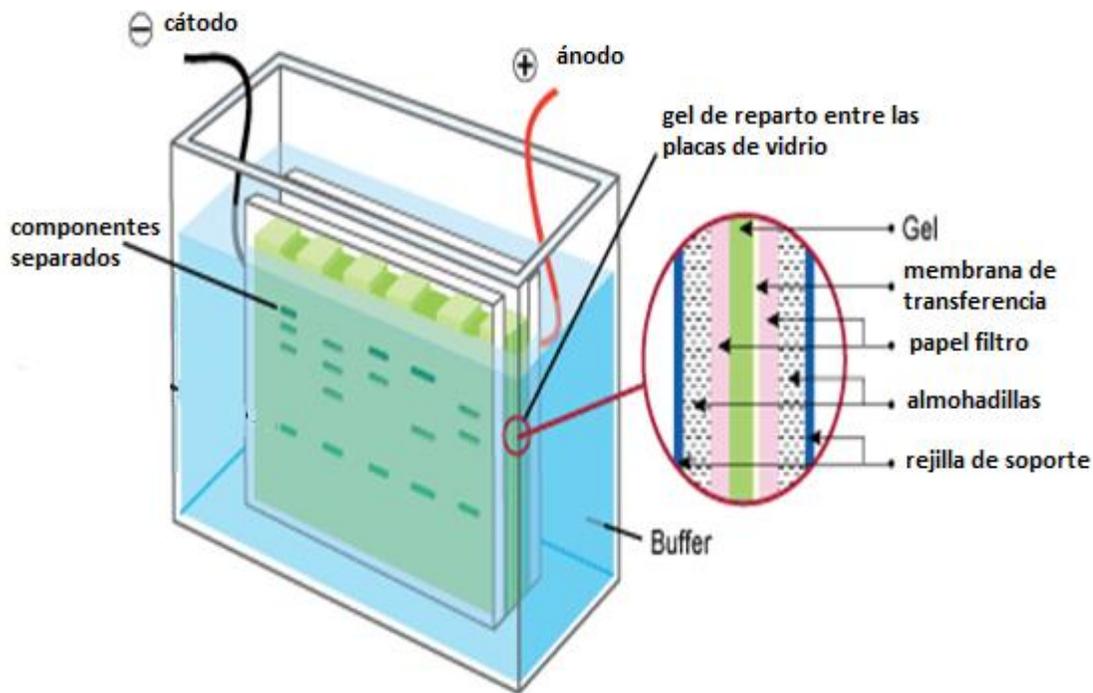


Figura 5.12 Técnica western blot en virología.

- Se emplean antígenos virales obtenidos por cultivo celular.
- Mediante electroforesis se separan las diferentes proteínas víricas por su diferente peso molecular.
- Posteriormente se transfieren las proteínas desde el gel a papel de nitrocelulosa.
- Coloración de las proteínas para confirmar transferencia.
- Bloqueo de los sitios de unión inespecíficos remanentes en la membrana de nitrocelulosa.<sup>(12)</sup>
- Incubación con el Ac específico.
- Lavados del Ac no unido.
- Detección del Ac específico utilizando un segundo Ac denominado conjugado (por estar marcado con material radiactivo como el  $I^{125}$ , o marcado enzimáticamente con peroxidasa, fosfatasa alcalina o quimioluminiscencia). (Ver figura 5.13)
- Detección con placas radiográficas. <sup>(9)</sup>

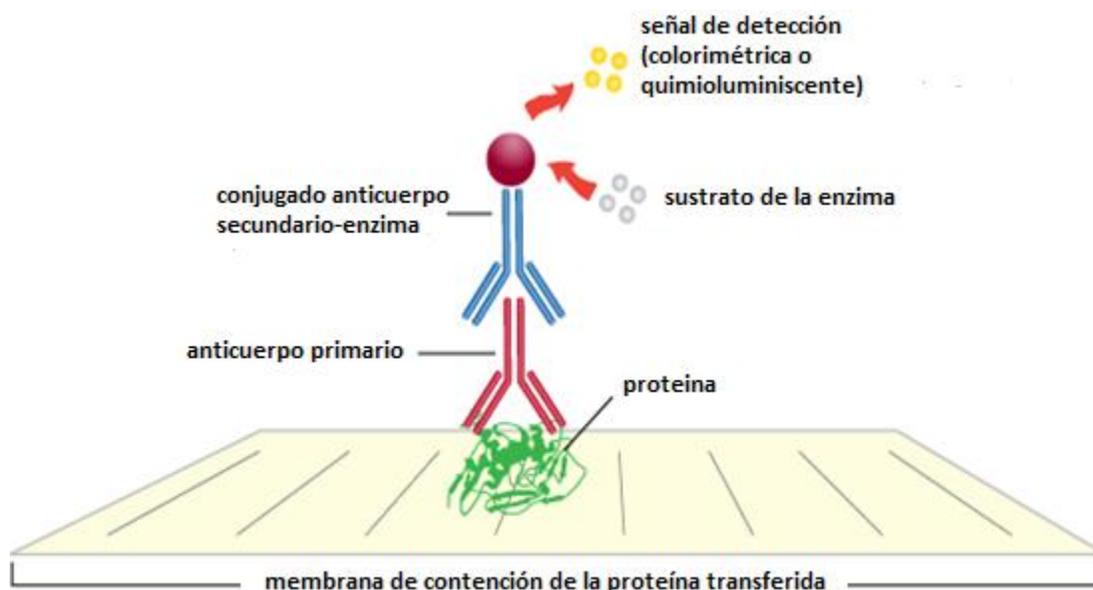


Figura 5.13 Western blot.

#### Aplicaciones en el área de virología

- Detección de VIH.
- Se emplea como prueba definitiva de VIH, VHC, encefalopatía espongiforme bovina, comúnmente llamada “enfermedad de las vacas locas”.
- Algunas clases de la prueba para la enfermedad de Lyme usan el western blot.
- En veterinaria, ocasionalmente se emplea el western blot para confirmar la presencia del FIV en gatos. <sup>(16)</sup>

#### 5.7 QUIMIOLUMINISCENCIA (QL)

##### Antecedentes históricos

Radzis Zenski descubrió, en 1877, compuestos luminiscentes; e incluso antes, en el año 1663, el científico alemán Boyle reconoció la existencia de la bioluminiscencia y la describió como “luz fría”.

En 1928, el químico alemán H. O. Albrecht descubrió las propiedades de un compuesto emisor de luz conocido como Luminol. Éste compuesto, al ser oxidado con peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en un medio alcalino y en presencia de un catalizador, el Luminol emite fotones en forma de luz. Sin embargo, el potencial de éste descubrimiento no fue reconocido sino hasta 1947, cuando se aisló por primera vez la Luciferasa de una luciérnaga; con base en lo cual, en 1952, Etrehler y Totter publicaron una aplicación analítica específica de la Luciferasa para el Adenosín Trifosfato (ATP). El término Luminiscencia fue introducido en 1888 por Eilhard Wiedemann. <sup>(17)</sup>

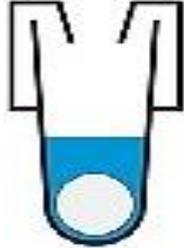
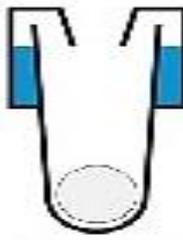
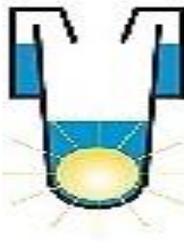


### Fundamento

La quimioluminiscencia consiste en términos generales en la producción química de la luz. Los marcadores quimioluminiscentes son sustancias capaces de emitir luz cuando, al absorber la energía de una reacción química oxidativa, son colocadas en un estado de excitación electrónica. La emisión de luz se produce al volver a su estado inicial y la energía química absorbida se cede en forma de fotones fácilmente cuantificables con un fotodetector. Los marcadores quimioluminiscentes constituyen una alternativa al uso de isótopos radiactivos en el inmunoanálisis, pues los compuestos quimioluminiscentes son de gran estabilidad y la emisión de luz sólo se produce cuando se provoca la reacción oxidativa siendo posible almacenar largo tiempo los compuestos luminiscentes. (15)

### Procedimiento

Cuadro 5.5 Procedimiento técnica de quimioluminiscencia.

Las muestras de sangre, se meten a centrifugar por 10 minutos a 3500rpm se sacan y se procede a separar el suero el cual será utilizado para el análisis.			
			
La muestra y el reactivo son pipeteadas automáticamente en la unidad de ensayo, la cual es entonces incubada a 37° C con una agitación intermitente	Tras la incubación la unidad de ensayo es centrifugada a alta velocidad sobre su eje vertical.	Una serie de lavados retira eficientemente el material no unido a la perla o a la parte interior del tubo.	El sustrato quimioluminiscente se añade a la unidad de ensayo. La emisión de luz leída con un foto contador de alta sensibilidad.

(18)

### Usos en el área de virología

En el proceso automatizado la quimioluminiscencia se utiliza para detección de:

- Rubéola
- Citomegalovirus
- Herpes
- VIH
- Hepatitis
- Varicela zoster
- Virus de Epstein barr



---

## REFERENCIAS

1. Krupp, Marcus A. et al (1986) Manual de diagnóstico clínico y de laboratorio. Editorial el manual moderno. 8ª ed. México (pp. 307-319).
2. Pruebas de infectividad en virus y diagnóstico serológico. (2007). Consultado el 19 de febrero de 2014. Disponible en <https://es.scribd.com/doc/6426331/Pruebas-de-Infectividad-y-Diagnostico-Serologico-en-Virologia>
3. Tema 7. Hemoaglutinación por virus. Consultado el 19 de febrero de 2014. Disponible en <https://docs.google.com/document/edit?id=1DiQxBOQBgsAOaAhEfg9h65K8aZsq-Uhn2olEeGZYKv8&hl=es&pli=1>
4. Shors, Teri (2009). Virus. Estudio molecular con orientación clínica. Consultado el 17 de noviembre 2014. Disponible en: <http://books.google.com.mx/books?id=T7Q1CBUIq0cC&pg=PA91&dq=hemoaglutinaci%C3%B3n+viral&hl=es&sa=X&ei=K-JLVPLCOsm68QGdzoHwDA&ved=0CCgQ6AEwAg#v=onepage&q=hemoaglutinaci%C3%B3n%20viral&f=false>
5. Pruebas de diagnóstico de virus: Inhibición de la hemoaglutinación y neutralización (2007). Consultado el 22 de febrero de 2014. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/6854677/Virologia-Practica-07-Pruebas-de-diagnostico-de-virus-Inhibicion-de-la-hemoaglutinacion-y-neutralizacion>
6. Luttman Werner (2009) Manual de técnicas de investigación en el laboratorio. Editorial Acribia S.A., Zaragoza, España. (pp. 112-123).
7. García Rodríguez, Carmiña (2007). Ventajas del método de quimioluminiscencia frente al de radioinmunoanálisis (RIA). Visión científica N°2 Vol. 1.
8. Gamarra Iglesias, Antonio. et al. (2002) Historia de los anticuerpos anti nucleares. Revista colombiana de reumatología Vol. 9 N° 4. Consultado el 26 de febrero de 2014. Disponible en <http://www.revistacolombianadereumatologia.org/Portals/0/Descargas/8-historia%20de%20los%20anticuerpos%209-4.pdf>
9. Rodríguez Padilla, Cristina (2010). Manual de inmunología. Trillas. México D.F.
10. Consultado el 17 de noviembre de 2014. Disponible en: [http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6\\_5.htm](http://www.medic.ula.ve/histologia/anexos/microscopweb/MONOWEB/capitulo6_5.htm)
11. Citometría de flujo: Fluorescence-Activated Cell Sorting (FACS), (2002). Consultado el 26 de febrero de 2014. Disponible en <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/FACS.pdf>
12. Tortora, Gerard, J., (2007). Introducción a la microbiología. Médica Panamericana. México.
13. Fernández, Nora (2007). E.L.I.S.A. Consultado el 2 de marzo de 2014. Disponible en <http://www.higiene.edu.uy/parasito/trabajos/elisa.pdf>
14. Protocolo y técnicas. Cultek. Consultado el 17 de noviembre de 2014. Disponible en: <http://www.cultek.com/inf/otros/soluciones/Soluciones-ELISA-protocolos.pdf>
15. Calderón Pascacio, Roció Vanessa,(2007)Curso de métodos fisicoquímicos en biotecnología. Instituto de biotecnología UNAM.



16. Western blot. Consultado el 2 de marzo de 2014. Disponible en <http://www.slideshare.net/gabo91/western-blot-10328376>
17. Nátaly Luz Avellán (2013) Quimioluminiscencia y Bioluminiscencia. Universidad de Cuenca, Escuela de Medicina.
18. Tecnología quimioluminiscencia de IMMULITE 1000. SIEMENS. Consultado el 2 de marzo de 2014. Disponible en [http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/PSGenericDisplay~q\\_catalogId~e\\_-105~a\\_langId~e\\_-105~a\\_pageId~e\\_107126~a\\_storeId~e\\_10001.htm](http://www.medical.siemens.com/webapp/wcs/stores/servlet/PSGenericDisplay~q_catalogId~e_-105~a_langId~e_-105~a_pageId~e_107126~a_storeId~e_10001.htm)

Imágenes.

Figura 5.6 Recuperado de <http://videosdigitals.uab.es/cr-vet/www/21277/pruebas%20serologicas.pdf>

Figura 5.2, 5.5, 5.10 Recuperado de <http://books.google.com.mx/books?id=Nxb3iETuwpIC&pg=PA540&dq=hemaglutinacion&hl=es-419&sa=X&ei=UfM2VO30HYS7ggTq9oHICQ&ved=0CckQ6AEwAw#v=onepage&q&f=false>

Figura 5.7 Recuperado de <http://epidemiologiamolecular.com/reacciones-inmunoenzimaticas-ii/>

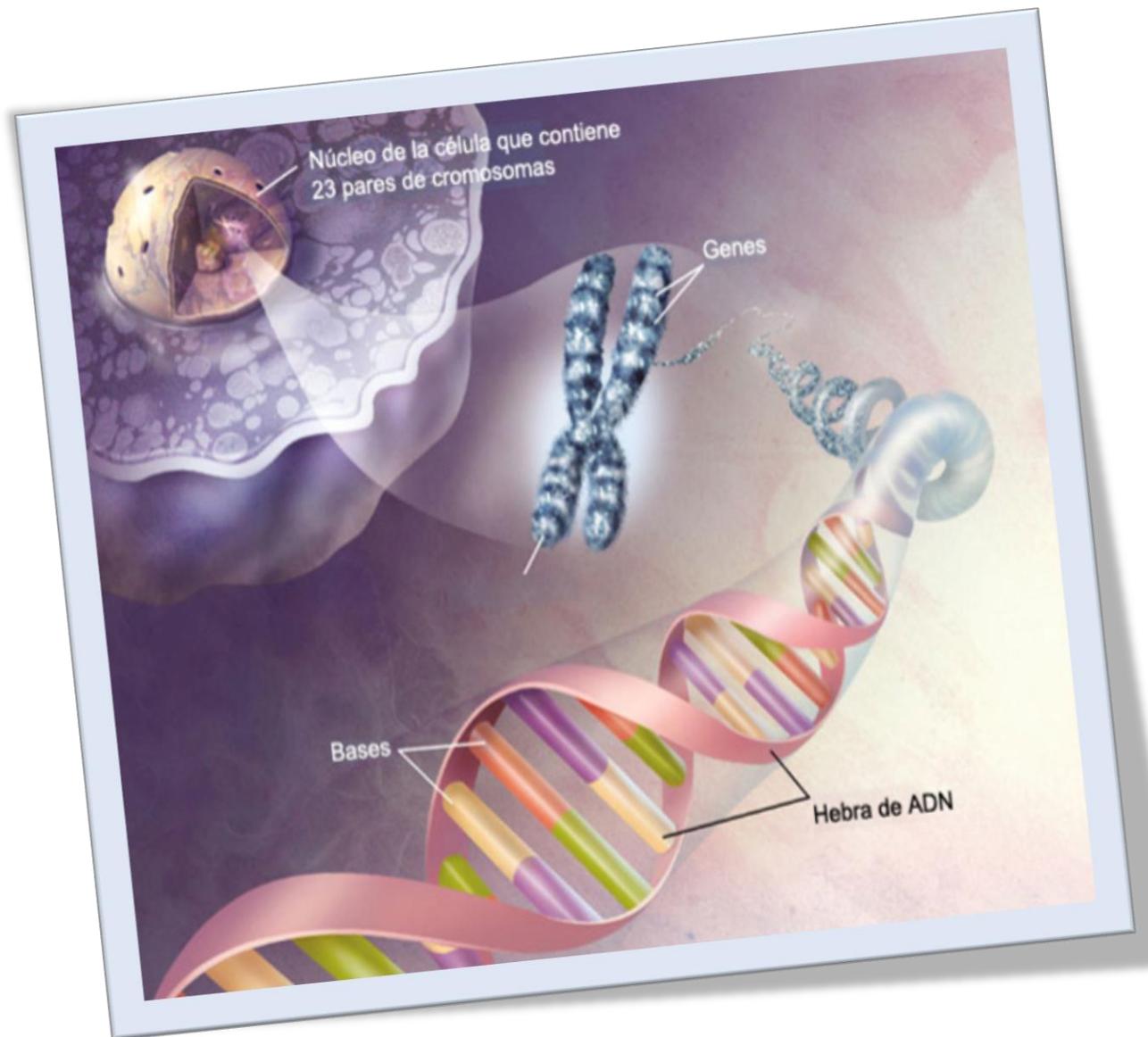
Figura 5.8, 5.12, 5.13 Recuperado de [www.leinco.com](http://www.leinco.com)

Figura 5.9 Recuperado de [lookfordiagnosis.com](http://lookfordiagnosis.com)

Figura 5.11 Recuperado de <http://www.piercenet.com/media/ELISAFormats575x214.jpg>

# 6.

## PRUEBAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR



## 6. PRUEBAS DE BIOLOGÍA MOLECULAR

El concepto de “biología molecular”, ha tomado el significado nuevo y diferente de “ingeniería genética” o “manipulación genética”. Estas técnicas, que permite manipular ácidos nucleicos *in vitro* (es decir, fuera de células vivas u organismos) no constituyen una nueva disciplina, sino que son el resultado de desarrollos previos, durante los 50 años anteriores, de la bioquímica de la biología celular. Esta nueva y poderosa tecnología ha revolucionado la virología y, en gran medida, ha desplazado el foco de atención de la partícula vírica al genoma vírico.

La infección vírica ha sido usada a menudo para investigar el funcionamiento de las células “normales” (es decir, no infectadas); por ejemplo, para analizar la síntesis de macromoléculas.

En 1970, Howard Temin y David Baltimore identificaron conjuntamente la enzima transcriptasa inversa (DNA polimerasa RNA dependiente) en células infectadas por retrovirus. Este hallazgo derrocó el llamado “dogma central” de la biología en el que existía un flujo en un solo sentido de la información desde el DNA a través del RNA a la proteína, y reveló la plasticidad del genoma eucariota. Como consecuencia, la purificación de esta enzima de partículas de retrovirus permitió clonar DNAC, que aceleró intensamente el estudio de los virus con genomas RNA. En 1977, Richard Roberts y Phillip Sharp, independientemente, reconocieron que los RNAs mensajeros de adenovirus sufren cortes y empalmes (“splicing”, en inglés) para eliminar secuencias intermedias, lo que indica la existencia de características similares entre genomas virales y celulares.

Inicialmente al menos, el efecto de esta nueva tecnología consistió en trasladar el énfasis de la investigación de las proteínas a los ácidos nucleicos. Conforme se desarrollaba la capacidad de las técnicas, pronto resultó posible determinar las secuencias nucleotídicas de genomas virales completos.

Esta tecnología centrada en los ácidos nucleicos, además de sus últimos logros de secuenciación genómica y manipulación artificial de los genomas virales, también ofreció avances significativos en la detección de virus e infecciones víricas mediante técnicas de hibridación de ácidos nucleicos. Existen muchas variaciones de esta idea básica, pero, esencialmente consiste en hacer reaccionar una sonda de hibridación, marcada de algún modo para facilitar su detección, con una mezcla compleja de ácidos nucleicos. La interacción específica de la secuencia de la sonda con secuencias complementarias del genoma del virus, a las que se une por formación de puentes de hidrógeno entre los pares de bases complementarias, revela la presencia de material genético vírico. Esta estrategia se ha elevado a un nivel superior mediante el desarrollo de procedimientos de amplificación de ácidos nucleicos *in vitro*. (1)



## 6.1 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

### Antecedentes históricos

La historia del desarrollo de la PCR es ciertamente curiosa. La técnica tuvo tanto impacto en el mundo científico, que en 1993 le fue concedido el Premio Nobel de Química a su inventor “oficial”, Kary B. Mullis, quien describió el proceso en 1985 y 1988. Sin embargo, catorce años antes (1971 y 1974), el Dr. Molineux, del grupo de Khorana, describió la misma técnica con exquisito detalle, aunque, lamentablemente, consideraron que dicha metodología no era funcional.

Desde su “redescubrimiento oficial” en 1985, la PCR se ha consolidado como la técnica clave de la biología molecular actual, como lo demuestra el número creciente de trabajos científicos que la utilizan. <sup>(2)</sup>

### Fundamento

La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos repetidos en los que la secuencia blanco es copiada fielmente. Para ello, la reacción aprovecha la actividad de la enzima DNA polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el DNA en las células. En la reacción, si usamos como sustrato DNA genómico, entonces típicamente hablamos de una PCR, pero si usamos DNA complementario (DNAc) proveniente del RNAm (ácido ribonucleico mensajero) se le conoce como RT-PCR (*Reverse Transcription-PCR*, por sus siglas en inglés). Esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa y controlada por la enzima transcriptasa reversa, capaz de convertir el RNAm en una molécula de DNAc. Este método fue copiado de los retro virus que usan una transcriptasa reversa para convertir su genoma de RNA en DNA duplicarse en millones de partículas virales. <sup>(3)</sup>

### Procedimiento

La amplificación *in vitro* del DNA se logra en tres pasos básicos:

- a) **Desnaturalización del DNA a copiar (molde o diana).** Ello se consigue incrementando la temperatura (90-98°C) para separar las dos cadenas que componen la doble hélice del DNA.
- b) **Hibridación o apareamiento de los cebadores u oligonucleótidos al DNA molde.** Para ello se baja la temperatura de reacción (50-60°C), de forma que pequeñas secuencias de DNA de cadena sencilla (típicamente, entre 10 y 30 bases o meros) se unan a sus secuencias complementarias del DNA diana. Cada uno de ellos se une a una de las cadenas del DNA diana, de forma que sus extremos 3'-OH apuntan el uno hacia el otro, delimitando la secuencia a amplificar.
- c) **Copia de las cadenas delimitadas por los cebadores.** Se consigue elevando la temperatura de la reacción a la óptima de la polimerasa de DNA utilizada (72°C). Cada uno de los extremos 3'-OH de los oligos apareados a las cadenas directa y reversa serán extendidos, generándose las cadenas hijas correspondientes. El resultado son dos hélices completas en la región delimitada por los oligos. Dicho de otra forma, se duplica el número inicial de moléculas de DNA. <sup>(4)</sup> (Ver figura 6.1)

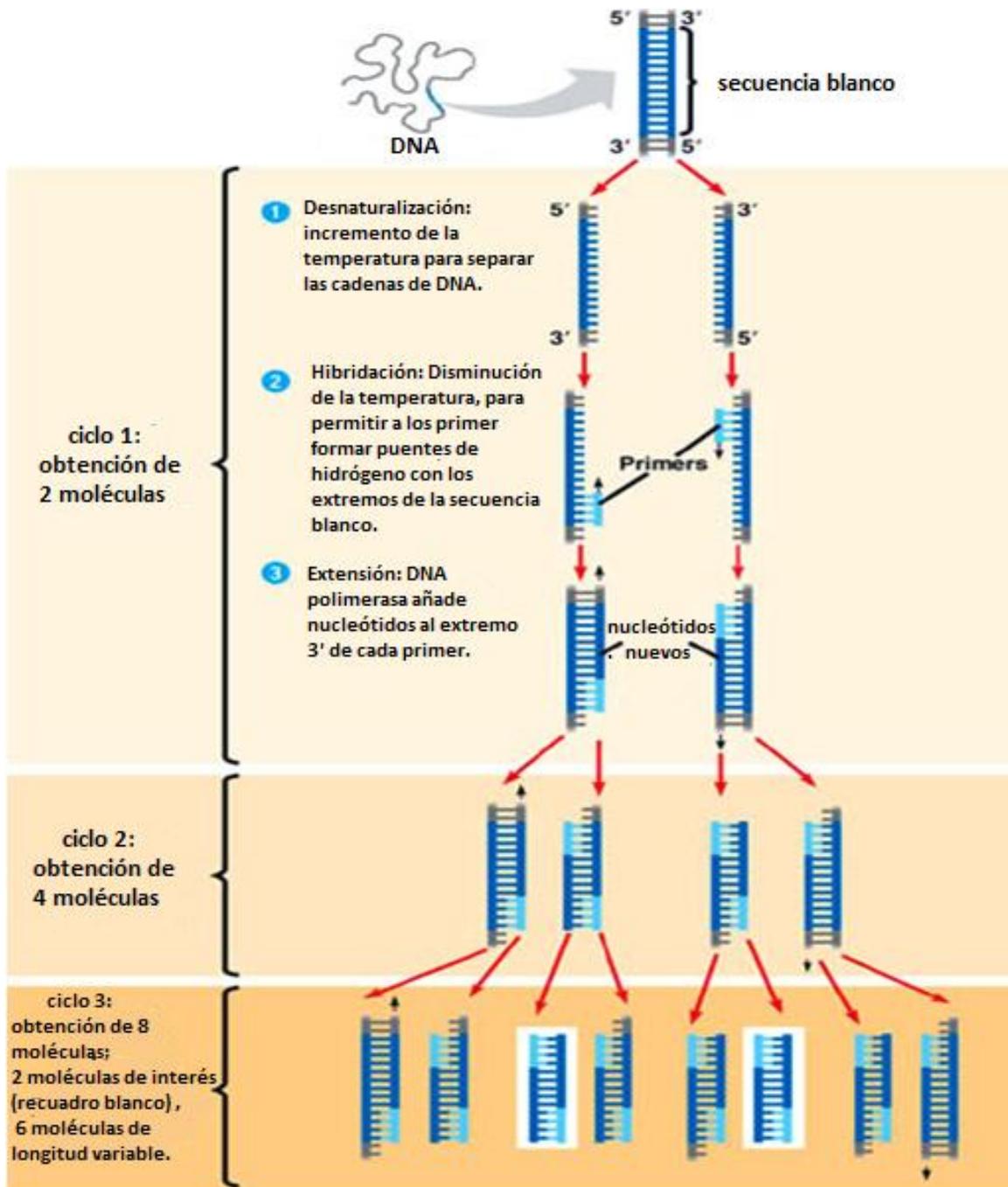


Figura 6.1 Reacción en cadena de la polimerasa.

### Usos en el área de virología

La PCR se utiliza para detectar la presencia de VIH, CMV, VHB, VHC, VPH, hantavirus, herpes (1 y 8), rabia, VEB, influenza, VRS, ébola, así como una gran variedad de patógenos (bacterias, parásitos, etc.).



## 6.2 POLIMORFISMOS DE LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP-Restriction Fragment Length Polymorphism).

### Antecedentes históricos

A finales de la década del 60, el descubrimiento de las endonucleasas de bacterias (enzimas de restricción con muy alta especificidad), las cuales cortaban el DNA en secuencias definidas de generalmente 4-8 pb, conllevó al desarrollo de técnicas para el aislamiento y la manipulación de fragmentos de DNA. Una de las mayores aplicaciones de esta técnica fue el ensamblaje de los mapas genéticos con el polimorfismo en longitud de los fragmentos de restricción. (5)

### Fundamento

EL RFLP se refiere a secuencias específicas de nucleótidos en el DNA que son reconocidas y cortadas por las enzimas de restricción (también llamadas endonucleasas de restricción) y que varían entre individuos. Las secuencias de restricción presentan generalmente patrones de distancia, longitud y disposición diferentes en el DNA de diferentes individuos de una población, por lo que se dice que la población es polimórfica para estos fragmentos de restricción.

La técnica de RFLP se basa en la acción de las enzimas de restricción, que cortan en secuencias objetivo específicas, el producto de PCR digerido con estas enzimas produce un patrón de bandas de diferentes tamaños y éstas son separadas de acuerdo a su longitud en un gel de electroforesis para su visualización. (6)

### Procedimiento

El DNA de un individuo se extrae y se purifica. El DNA purificado puede ser amplificado usando la técnica PCR, luego es tratado con enzimas de restricción específicas para producir fragmentos de DNA de diferentes longitudes. Los fragmentos de restricción se separan mediante electroforesis en geles de agarosa. Esto proporciona un patrón de bandas que es único para un DNA en particular. (7) (Ver figura 6.2)

El procedimiento general es:

- Digestión del DNA con enzimas de restricción;
- Separación por electroforesis de los fragmentos resultantes.
- Transferencia de los fragmentos separados a membranas de nitrocelulosa (Southern blotting).
- Hibridación con sondas moleculares radiactivas.
- Exposición de la membrana a un filme de rayos X. La identificación del polimorfismo también puede hacerse por PCR. (8)

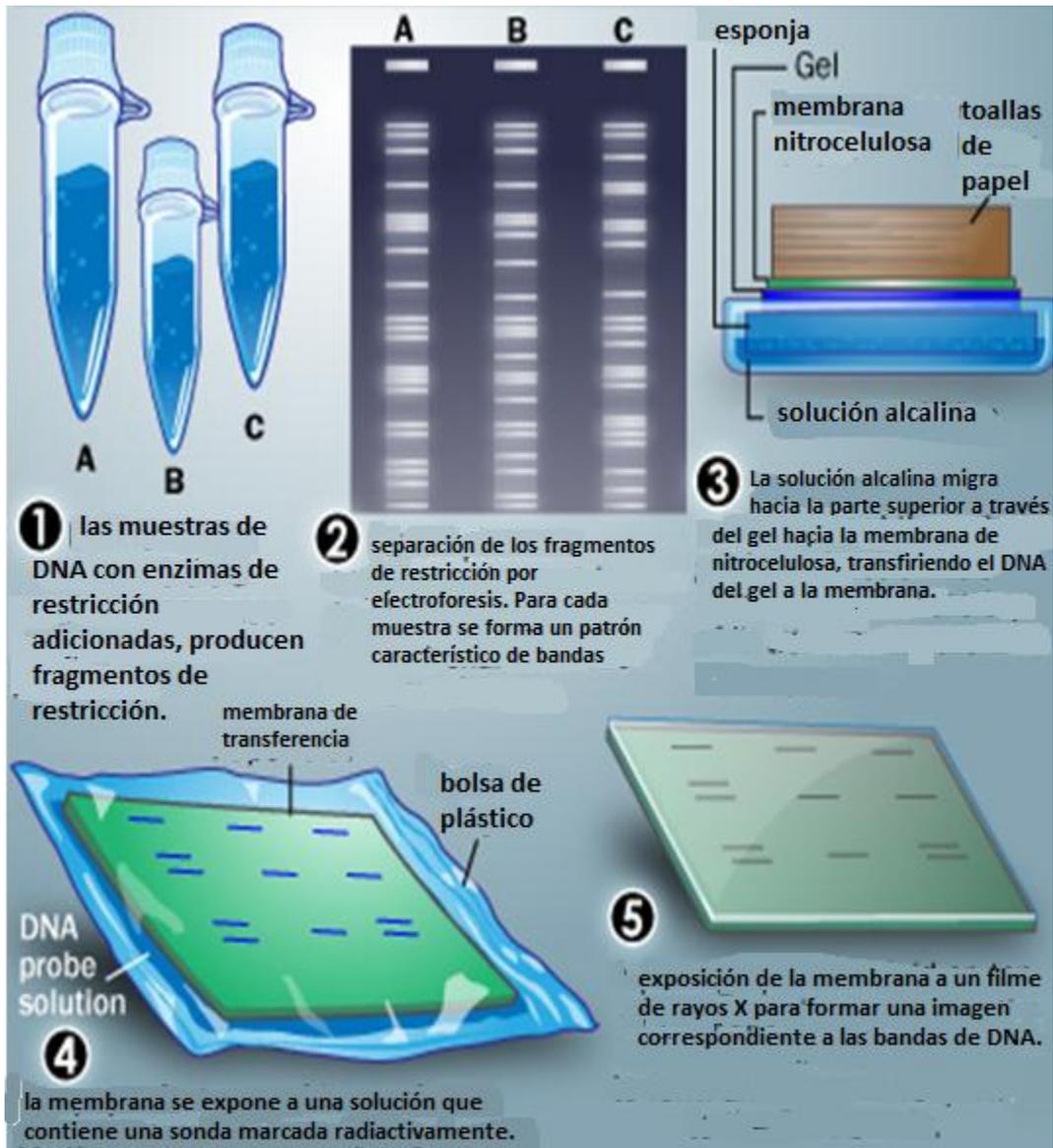


Figura 6.2 Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción.

### Usos en el área de virología

La técnica RFLP se usa para determinar variantes en un virus, también como marcador para identificar grupos particulares de personas con riesgo a contraer ciertas enfermedades genéticas, en ciencia forense, en pruebas de paternidad y en otros campos, ya que puede mostrar la relación genética entre individuos. (9)



### 6.3 HIBRIDACIÓN (NORTHERN BLOT Y SOUTHERN BLOT)

Las técnicas de hibridación molecular se basan en el estudio de secuencias específicas del DNA o RNA, tanto para su identificación como para su final cuantificación. Para realizarlas se parte de sondas que son secuencias de DNA o de RNA de tamaño de entre 10-30 pb (oligonucleótidos marcados con una enzima, isótopo radiactivo o fluorocromo), complementarias a aquellas que se quieren detectar. La hibridación o acoplamiento de la secuencia génica diana y la sonda complementaria se puede reconocer con métodos radiactivos y colorimétricos. En general, se utilizan sondas previamente marcadas con sustancias radiactivas o fluorescentes. <sup>(10)</sup>

Ventajas:

- La técnica de hibridación es muy sensible y específica para la detección de ácidos nucleicos.

Desventajas:

- El procedimiento es laborioso.
- El procedimiento ha usado históricamente sondas radiactivas para la detección de los ácidos nucleicos. <sup>(11)</sup>

### SOUTHERN BLOT Y NORTHERN BLOT

#### Fundamento

Estas técnicas comienzan con la separación que se hace mediante electroforesis y después este DNA o RNA es transferido a membranas de nylon o nitrocelulosa (blot). Después, para la identificación de la banda que interesa se realiza un proceso llamado hibridación, en el que la membrana es "incubada" con un fragmento de DNA o RNA complementario al gen de interés (sonda) previamente marcada, generalmente con moléculas fluorescentes lo que permite posteriormente su visualización si se ha producido unión. <sup>(12)</sup>

#### Procedimiento

El procedimiento general se muestra en el cuadro 6.1 y figura 6.3

**Cuadro 6.1 Procedimiento Southern y Northern blot.**

BLOTTING		
	SOUTHERN	NORTHERN
ANALIZA	DNA	RNA
Procedimiento		
1. Preparación de la muestra	Se corta en fragmentos (enzimas de restricción)	Nada
2. Separación por electroforesis	Tamaño	Tamaño
3. Tratamiento en gel	Desnaturalizar el DNA con álcali	Nada
4. Transferir a una membrana	Por capilaridad	Por capilaridad
5. Identificar moléculas de interés	Sonda de RNA radioactiva o DNA cadena simple	Sonda de RNA radioactiva o DNAsc

<sup>(13)</sup>

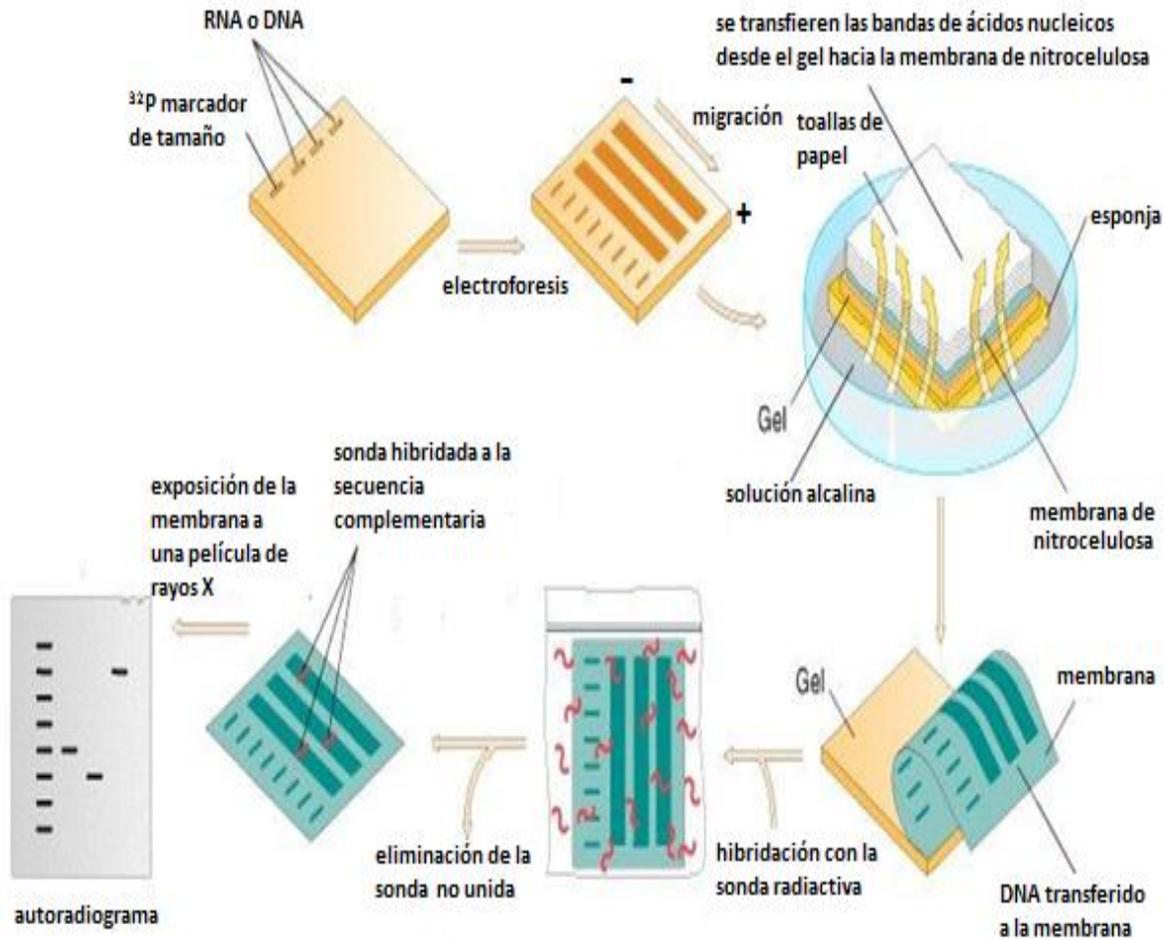


Figura 6.3 Técnica de hibridación.

### Usos en el área de virología

Esta técnica se sigue con éxito para evidenciar la presencia de papilomavirus en biopsias o raspados cervicales, en la demostración *in situ* de cantidades pequeñas de virus:

- Hepatitis B
- Epstein Barr
- HSV tipo I
- CMV
- ADV
- Rotavirus

Se dispone de estuches comerciales de sondas para el descubrimiento de CMV, HSV y ADV. También se utilizan para identificar las secuencias complementarias del virus de hepatitis E, identificar el parvovirus B19 en suero, en leucocitos, en secreciones respiratorias, en orina y tejidos; para los virus de hepatitis A, B y C también hay sondas disponibles. (14)



## 6.4 SECUENCIACIÓN

### Antecedentes históricos

Inicialmente, se pensaba que la secuenciación de los ácidos nucleicos era mucho más difícil que la de las proteínas, y muy poco progreso se hizo hasta 1960.

Esto se debió, en parte, a la falta de substratos puros del tamaño adecuado, con los cuales desarrollar los métodos y en parte, a la composición de los ácidos nucleicos. Se esperaba que la interpretación de los resultados de la secuenciación de los ácidos nucleicos (cuatro monómeros) fuera más difícil que el de las proteínas (20 aminoácidos), y se tendrían que aislar productos de degradación más grandes para poder traslaparlos y deducir sus secuencias.

El primer ácido nucleico en ser secuenciado fue el tRNA<sup>Ala</sup> de levadura. La secuencia de este nucleótido de 76 bases fue realizada por Holley y colaboradores en siete años. Ellos usaron métodos de secuenciación similares a los que se usaban para secuenciar proteínas.

Poco después, Frederick Sanger y sus colaboradores dirigieron sus esfuerzos para desarrollar técnicas de fraccionamiento más rápidas y simples, las cuales permitieron la secuenciación de RNA y luego de DNA. El grupo de Sanger marcó el RNA con P<sup>32</sup>, y pudo detectarlo mediante autoradiografías. Además, introdujeron un método más sencillo para fraccionar los oligonucleótidos. Una técnica de separación bidimensional, con electroforesis en acetato de celulosa, seguido de la electroforesis de intercambio iónico en papel. (15)

### Fundamento

Está basado en el empleo de didesoxinucleótidos (Ver figura 6.4) que carecen de uno de los grupos hidroxilo, de manera que cuando uno de estos nucleótidos se incorpora a una cadena de DNA en crecimiento, está cadena no puede continuar elongándose ya que la DNA polimerasa necesita un extremo 3' OH para añadir el siguiente nucleótido y el desoxinucleótido incorporado carece de este grupo hidroxilo. (16)

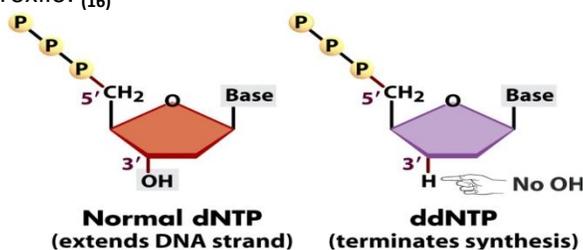


Figura 6.4 Desoxinucleótidos.

Métodos clásicos de secuenciación:

Los dos protocolos clásicos de secuenciación (método químico y enzimático) comparten etapas comunes.

- **Marcado:** Es necesario marcar las moléculas a secuenciar radiactiva o fluorescentemente.
- **Separación:** Cada protocolo genera una serie de cadenas sencillas de DNA marcadas cuyos tamaños se diferencian en una única base. Estas cadenas de distintas longitudes pueden separarse por electroforesis en geles desnaturizantes de acrilamida-bisacrilamida-urea, donde aparecen como una escalera de bandas cuya longitud varía en un único nucleótido.



Para obtener estas cadenas se emplean dos procedimientos:

- **Método químico de Maxam y Gilbert.**  
Esta técnica consiste en romper cadenas de DNA de cadena sencilla marcadas radiactivamente con reacciones químicas específicas para cada una de las cuatro bases. Los productos de estas cuatro reacciones se resuelven, por electroforesis, en función de su tamaño en geles de poliacrilamida donde la secuencia puede leerse con base en el patrón de bandas radiactivas obtenidas.
- **Método enzimático de Sanger**  
Este método de secuenciación de DNA se conoce como método de los terminadores de cadena o dideoxi. Para este método resulta esencial disponer de un DNA de cadena simple (molde) y un iniciador, cebador o "primer" complementario de una región del DNA molde anterior a donde va a iniciarse la secuencia. Este cebador se utiliza como sustrato de la enzima DNA polimerasa I que va a extender la cadena copiando de forma complementaria el molde de DNA.

#### Secuenciación automática empleando el método enzimático

Es una alternativa al método de Sanger. Consiste en marcar el oligo cebador o los terminadores con un compuesto fluorescente y activar la reacción de secuencia. Los productos de la reacción se detectan directamente durante la electroforesis al pasar por delante de un láser que al excitar los fluoróforos permite detectar la fluorescencia emitida.

- **Secuenciación empleando cebadores fluorescentes**  
Se realizan cuatro reacciones de secuencia distintas en cada una de las cuales se añade el oligonucleótido o cebador marcado con una sonda fluorescente distinta y un ddNTP diferente en cada una de ellas. Al finalizar las cuatro reacciones se mezclan en un único tubo.
- **Secuenciación empleando terminadores fluorescentes**  
Se realiza una única reacción de secuencia en presencia de los cuatro ddNTPs, cada uno de ellos marcados con una sonda fluorescente distinta. (17)

#### Procedimiento

1. En la secuenciación se utiliza un cebador o "primer" marcado radiactivamente que suministra el extremo 3'OH que necesita la DNA polimerasa.
2. Se preparan cuatro tubos de reacción, cada uno con el DNA molde de hélice sencilla que se desea secuenciar, con DNA polimerasa, con el cebador marcado y con los cuatro nucleótidos trifosfato.
3. A cada tubo se le añade una pequeña proporción de un dideoxinucleótido trifosfato, un tubo con ddATP, otro con ddTTP, el tercero con ddGTP y el cuarto con ddCTP.
4. En cada uno de estos tubos se producirán cadenas de ADN de distintas longitudes, terminando todas en el lugar en el que se incorporó el dideoxi correspondiente añadido al tubo.
5. Posteriormente, estas piezas de DNA se separan mediante electroforesis vertical en geles de acrilamida.



6. Las piezas más pequeñas migran más rápidamente que las grandes y la secuencia se puede leer directamente sobre el gel de acrilamida. (16)

El procedimiento se ilustra en la figura 6.5.

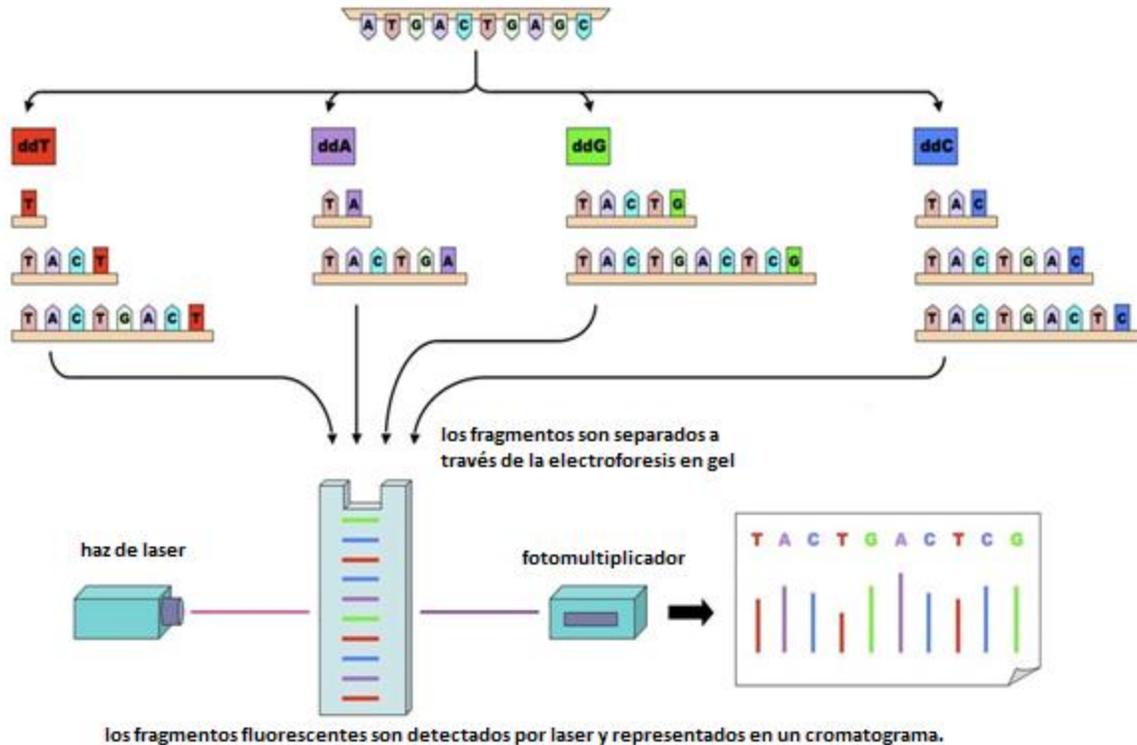


Figura 6.5 Secuenciación automática.

### Usos en el área de virología

Esta técnica se utiliza para detectar los materiales genéticos de los virus (RNA o DNA) por sondas DNA, para su estudio e identificación. (18)

## 6.5 HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH) Y MICROARREGLOS

### HIBRIDACIÓN FLUORESCENTE *IN SITU* (FISH)

#### Antecedentes históricos

Los métodos de hibridación molecular *in situ* para nucleos y cromosomas se han desarrollado debido principalmente a los esfuerzos de Gall y Pardue (1969), Pardue y colaboradores (1970) y John, Birnstiel y Jones (1969). En teoría el procedimiento permite el uso de cualquier fracción de RNA o DNA marcado para localizar el sitio específico de unión en el genoma, a condición de que haya suficiente radiactividad para la detección por autorradiografía. (19)



### Fundamento

La hibridación fluorescente *in situ* (FISH) utiliza moléculas fluorescentes para localizar genes o fragmentos de DNA. Esta técnica es especialmente útil para mapear genes o localizar anomalías cromosómicas.

La técnica consiste en preparar cortas secuencias de DNA de una sola hebra, llamadas sondas, que son complementarias de las secuencias de DNA que se quieren marcar y examinar. Estas sondas se marcan con moléculas fluorescentes (por ejemplo con biotina o fluoresceína). Estas sondas se hibridan o unen al DNA complementario y, como están marcadas con moléculas fluorescentes, permiten localizar las secuencias en las que se encuentran. A diferencia de otras pruebas utilizadas para estudiar los cromosomas que requieren que las células se encuentren en división activa, la hibridación fluorescente *in situ* puede ser llevada a cabo en células no activas. (12)

### Procedimiento

- Generación de ácidos nucleicos marcados para una detección subsecuente.
- Fijación de tejidos (seccionados), preparación de cromosomas.
- Preparación del tejido para incrementar el acceso del ácido nucleico marcado.
- Hibridación de la sonda marcada en cromosomas o tejidos.
- Lavados selectivos que remuevan las sondas que no hibridan. (15)

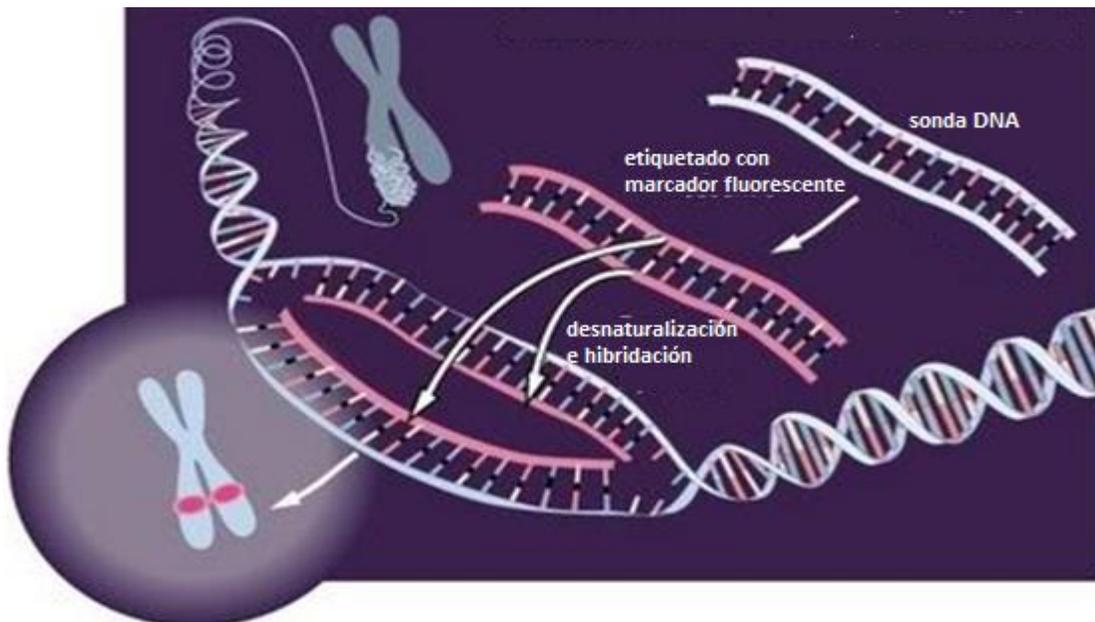


Figura 6.6 Hibridación fluorescente *in situ*.

### Usos en el área de virología

Es una técnica útil para establecer la presencia de ciertos virus en algunas neoplasias, como el VPH en las displasias o carcinomas espinocelulares de cuello uterino o el VEB en los trastornos linfoproliferativos postrasplante, en el linfoma de Burkitt, y el HHV-8 en el sarcoma de Kaposi. (20)



## MICROARREGLOS

### Antecedentes históricos

No hace muchos años, la mayoría de los investigadores interesados en observar cambios en los niveles de expresión de los genes, tenían que estudiarlos uno por uno. Actualmente con la tecnología de los microarreglos diseñada por Brown P.O. y Botstein D. en 1999, es posible hacer preguntas a todos los genes de un organismo determinado, en un solo experimento. (21)

### Fundamento

El microarreglo es una ingeniosa tecnología basada en la hibridación molecular: en una matriz de vidrio, silicona, o nylon, se sitúan o “anclan” sondas (“spots”) de oligonucleótidos (fragmentos de DNA) conocidos, y en una ubicación precisa. Sobre ellos se sitúan o “hibridan” fragmentos de DNA desconocido, procedentes de tejidos o muestras de pacientes. Las bases complementarias se reconocen y se visualiza su hibridación mediante el uso de sustancias fluorescentes, aunque también se puede utilizar quimioluminiscencia o radiactividad.

La miniaturización permite el anclaje, en unos pocos centímetros, de cientos de “spots” de oligonucleótidos, alineados en filas y columnas, cada uno de los cuales se corresponde a una secuencia específica del DNA.

De ésta reacción se obtiene un *puzzle* en el que la lectura de los puntos marcados permite identificar la presencia o ausencia de los diferentes fragmentos, y componer un cuadro genómico, o huella genética, para la muestra problema. La identificación puede ser, en ocasiones, laboriosa y puede precisar de la ayuda de algoritmos y programas informáticos que ayuden a la interpretación de los resultados.

Esta técnica, aunque habitualmente se asocia al estudio del DNA, también se puede aplicar al estudio de las proteínas e hidratos de carbono. (22)

### Procedimiento

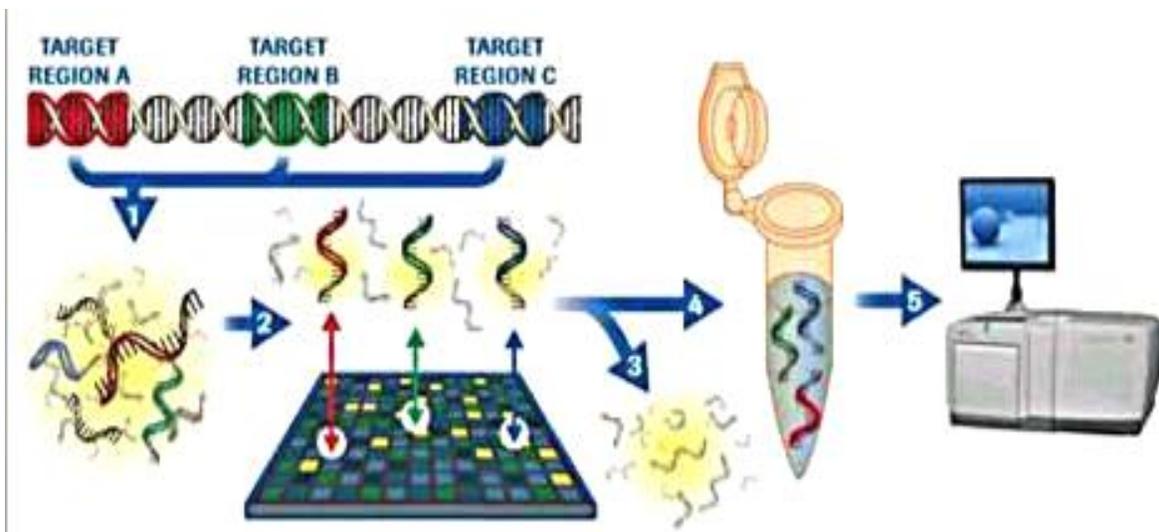


Figura 6.7 Procedimiento microarreglos.



1. **Extracción de RNA.** Existe una gran variedad de métodos para aislar RNA y su elección depende del origen de la muestra. Lo más importante es obtener un material de la más alta calidad.
2. **Síntesis y marcaje de DNAc.** Para marcar el RNA se utiliza una reacción de síntesis enzimática de DNAc de cadena sencilla.
3. **Hibridación.** Esta parte del proceso consta de tres pasos: Tratamiento de la laminilla, Preparación de las sondas marcadas e hibridación.
4. **Lectura y cuantificación.** Una vez que las sondas de DNAc son co-hibridadas sobre el microarreglo y que la laminilla se lava y seca, es necesario obtener la imagen producida por la fluorescencia de los spots que fueron reconocidos por el DNAc marcado. Para detectar dicha fluorescencia se necesita contar con un lector para microarreglos de preferencia con tecnología confocal. Este instrumento cuenta con dos láseres manipulables que nos permiten extraer la señal fluorescente a las longitudes de excitación apropiadas. (Ver figura 6.8)
5. En este instrumento el haz de laser pasa por una lente objetivo (de alta apertura numérica), como el de un microscopio común e incide sobre un punto en la laminilla del microarreglo.
6. De esta forma al desplazarse la laminilla por el haz de laser se va generando la imagen digital del microarreglo.<sup>(21)</sup> (Ver figura 6.7)

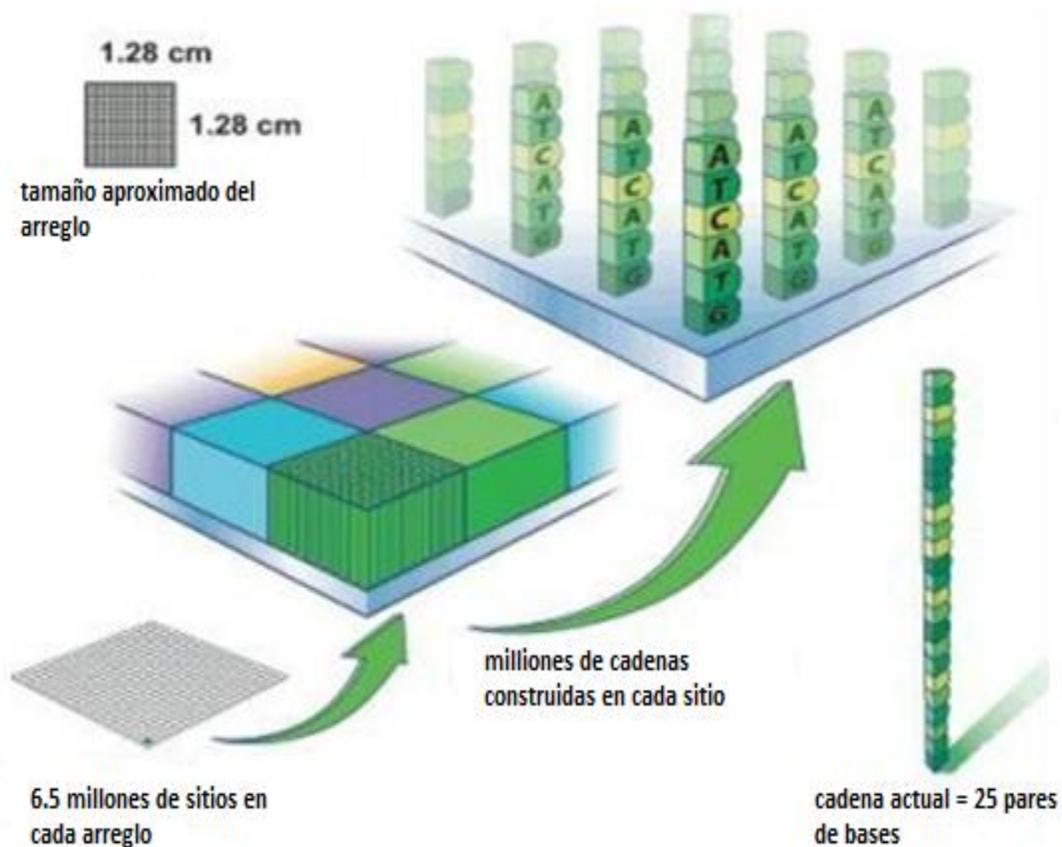


Figura 6.8 Fracción de un microarreglo.

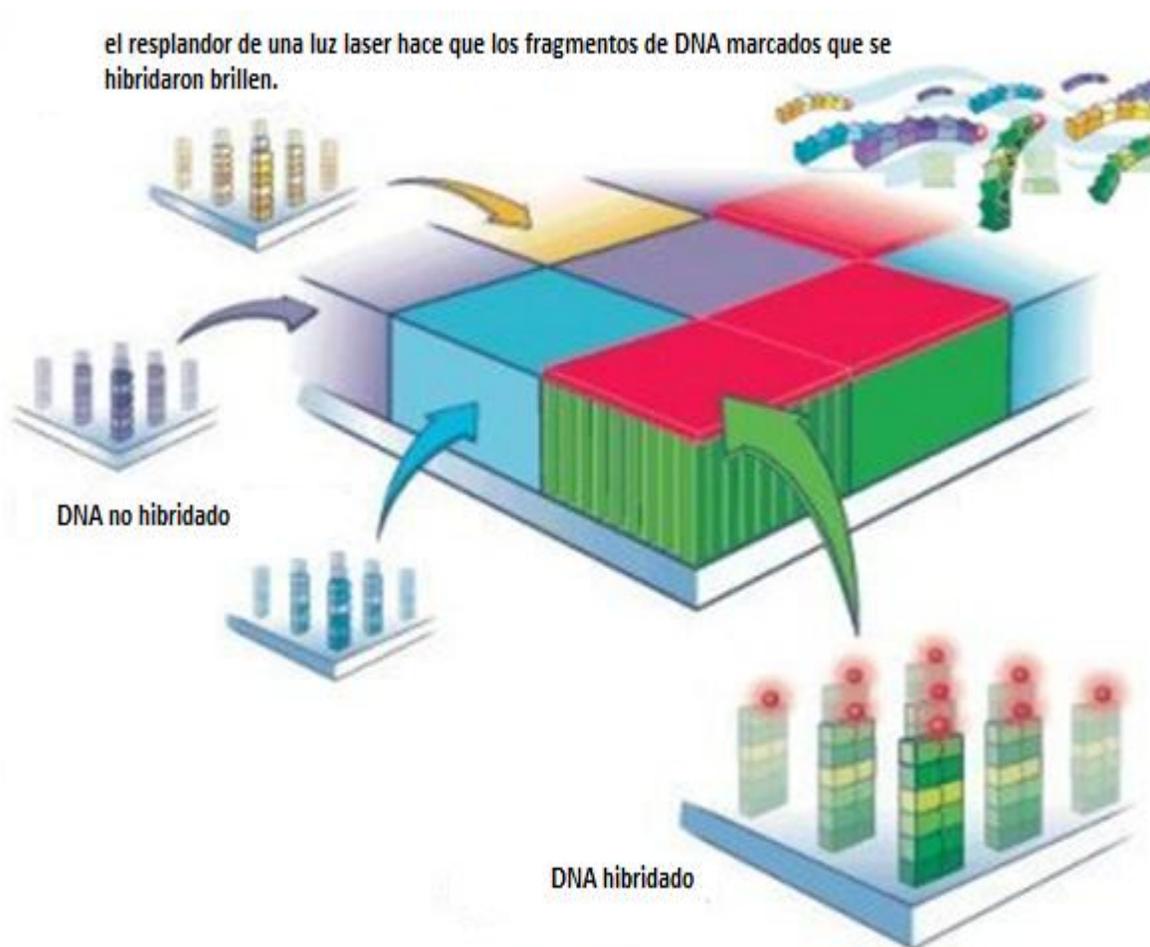


Figura 6.9 Microarreglo. Detección.

#### Usos en el área de virología

Con esta técnica se han encontrado patrones de expresión genética diferenciales en las células afectadas por microorganismos como:

- Virus coxsackie B3.
- Citomegalovirus.
- VPH 3.
- Virus del sarampión. <sup>(23)</sup>



## REFERENCIAS

1. Cann, Alan J. (2005). Principios de virología molecular. Zaragoza, España: Editorial Acribia.
2. Consultado el 12 de abril de 2014. Disponible en [www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf](http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/530/cap17.pdf)
3. Consultado el 12 de abril de 2014. Disponible en <http://www.medigraphic.com/pdfs/invdiss/ir-2013/ir132d.pdf>
4. Consultado el 12 de abril de 2014. Disponible en [www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/44%20PCR.pdf](http://www.uco.es/dptos/bioquimica-biol-mol/pdfs/44%20PCR.pdf)
5. Consultado el 20 de abril de 2014. Disponible en [http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Mejora\\_genetica/Documentos/2012/MARCAD ORES%20GENETICOS%20Y%20APLICACIONES.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Mejora_genetica/Documentos/2012/MARCAD ORES%20GENETICOS%20Y%20APLICACIONES.pdf)
6. Consultado el 20 de abril de 2014. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/104106580/Polimorfismos-de-longitud-de-fragmentos-de-restriccion>
7. Consultado el 20 de abril de 2014. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/104106580/Polimorfismos-de-longitud-de-fragmentos-de-restriccion>
8. Consultado el 20 de abril de 2014. Disponible en [http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Mejora\\_genetica/Documentos/2012/MARCAD ORES%20GENETICOS%20Y%20APLICACIONES.pdf](http://www.vet.unicen.edu.ar/html/Areas/Mejora_genetica/Documentos/2012/MARCAD ORES%20GENETICOS%20Y%20APLICACIONES.pdf)
9. Consultado el 2 de mayo de 2014. Disponible en <http://es.scribd.com/doc/104106580/Polimorfismos-de-longitud-de-fragmentos-de-restriccion>
10. Consultado el 2 de mayo de 2014. Disponible en <http://www.conganat.org/seap/revista/v30-n3/13.pdf>
11. Consultado el 2 de mayo de 2014. Disponible en <http://www.gene-quantification.de/poster-southern-northern.jpg>
12. INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA Curso de Métodos Físicoquímicos en Biotecnología IBT Consultado el 20 de junio de 2014. Disponible en <http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/inmunoquimica.pdf>
13. Consultado el 20 de junio de 2014. Disponible en [http://www.fmv-uba.org.ar/grado/medicina/ciclo\\_biomedico/segundo\\_a%C3%B1o/bioquimica/molecular.pdfSOUT](http://www.fmv-uba.org.ar/grado/medicina/ciclo_biomedico/segundo_a%C3%B1o/bioquimica/molecular.pdfSOUT)
14. *El diagnóstico viral por el laboratorio*. María del Pilar Crespo, Bact., M.Sc.\*pdf Consultado el 20 de junio de 2014. Disponible en <http://www.bioline.org.br/pdf?rc00024>
15. Consultado el 20 de junio de 2014. Disponible en [http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion\\_acidos\\_nucleicos.pdf](http://www.ibt.unam.mx/computo/pdfs/met/secuenciacion_acidos_nucleicos.pdf)
16. Consultado el 24 de junio de 2014. Disponible en <http://pendientedemigracion.ucm.es/info/genetica/AVG/problemas/Rflp172.htm>
17. Consultado el 24 de junio de 2014. Disponible en <http://www2.iib.uam.es/seq/tecnicas/biomed1.htm>
18. Consultado el 24 de junio de 2014. Disponible en <http://books.google.com.mx/books?id=p2BmCezyycsC&pg=PA110&lpg=PA110&dq=aplicaciones+de+secuenciacion+en+virologia&source=bl&ots=QIRmfocdFE&sig=7cPyQR54T3SSa-tO4FUN5ILHim4&hl=es->



- 419&sa=X&ei=rx84VJr\_LsjH8AHQoYHADQ&ved=0CDIQ6AEwAw#v=onepage&q=aplicaciones%20de%20secuenciacion%20en%20virologia&f=false
19. Consultado el 28 de junio de 2014. Disponible en <http://www.genetics.org/content/69/2/163.full.pdf>
  20. Koneman, Elmer W. (2008). Diagnóstico microbiológico: texto y atlas en color Buenos Aires; México : Médica Panamericana.
  21. Consultado el 29 de junio de 2014. Disponible en <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/microarreglos.pdf>
  22. Consultado el 29 de junio de 2014. Disponible en <http://www.centre-analisis.com/Portals/0/monograficos%20pdf/La%20revoluci%C3%B3n%20del%20Microarray.pdf>
  23. Consultado el 29 de junio de 2014. Disponible en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=181221636005>

#### Imágenes

Figura 6.1 Recuperado de <http://www.foodsafetywatch.org/wp-content/uploads/2013/03/Revolution-pic2.jpg>

Figura 6.2 Recuperado de <http://science.howstuffworks.com/dna-profiling1.htm>

Figura 6.3 Recuperado de <http://www.mun.ca/biology/scarr/Gr12-18.html>

Figura 6.4 Recuperado de [www.uic.edu](http://www.uic.edu)

Figura 6.5 Recuperado de [http://voyager.blog.hu/2013/11/29/81\\_hogy\\_tortenik\\_a\\_dns\\_szekvenalas](http://voyager.blog.hu/2013/11/29/81_hogy_tortenik_a_dns_szekvenalas)

Figura 6.6 Recuperado de <http://www.esimer.com/blog/tag/pruebas-complementarias-estudio-fertilidad/>

Figura 6.7, 6.8, 6.9 Recuperado de <http://www.actasdermo.org/es/farmacogenetica-ii-metodos-moleculares-estudio/articulo/13099342/>

# APÉNDICES.



### Ventajas y desventajas de las técnicas diagnósticas aplicadas en virología.

Técnica diagnóstica	Ventaja de su uso	Desventaja de su uso
<b>Cultivos celulares</b>	En un cultivo se pueden controlar todos los factores del medio: físico-químicos (pH, temperatura, presión osmótica, niveles de O <sub>2</sub> , CO <sub>2</sub> , tensión superficial, etc.), y fisiológicos (hormonas, factores de crecimiento, densidad celular, etc.).	Su eficacia depende del momento en que se tome la muestra, del transporte óptimo y rápido de las muestras; además que se debe escoger el tipo de células que sean permisivas para el virus que se va a demostrar. Su mal manejo genera contaminaciones.
<b>Huevos embrionados</b>	Son estériles, no tienen funciones inmunológicas desarrolladas, no son costosos.	No sirven para todos los virus, sólo para los que interactúan con glóbulos rojos especie específicos. Susceptibles a contaminaciones.
<b>Animales de laboratorio</b>	Algunos poseen características similares a las de los seres humanos. Algunos son de fácil reproducción. El sistema permite aislar algunos virus que no crecen en otros sistemas de cultivo viral. Son un medio para estudiar el efecto de antivirales y las patogenicias.	Pueden ser portadores de virus que producen infecciones latentes, por lo que podría causar errores en el estudio de aislamiento de un agente a partir de una muestra clínica. El costo que sería mantener colonias sanas, bien alimentadas y la infraestructura necesaria para mantener los animales sanos y enfermos separadamente. Ética, evitar el sacrificio de de muchos animales.
<b>Fijación de complemento</b>	Los anticuerpos fijadores del complemento duran sólo algunos años después de la infección, de modo que son indicadores de un proceso reciente.	Sensibilidad y especificidad no muy altas. Método en desuso por todos los reactivos que implica tener disponibles.
<b>Aglutinación</b>	Es fácil de realizar, requiere sólo unos minutos y no necesita equipo, ya que se lee a simple vista.	Presencia de reacciones cruzadas sobre todo con otros antígenos en la muestra. Baja sensibilidad y especificidad.
<b>Neutralización viral</b>	Mide funciones virales específicas, por lo que es bastante selectivo. Se considera el método estándar de oro en virología.	Disponer de líneas celulares adecuadas y por lo general se hacen en laboratorios donde se tiene toda la infraestructura para los cultivos celulares.

Técnica diagnóstica	Ventaja de su uso	Desventaja de su uso
<b>Radioinmunoanálisis</b>	Muy sensible, rápido y fácil.	Instalaciones costosas, vida media de los isotopos es corta, uso de material radioactivo.
<b>Inmunofluorescencia</b>	Se pueden obtener resultados rápidos, no es necesario realizar cultivos, es sensible.	Requiere de microscopio de fluorescencia, depende de la subjetividad del observador.
<b>Clasificación de células activadas por fluorescencia</b>	Es el método de elección para el aislamiento de las poblaciones altamente purificada de células.	Requiere de equipo especializado y la capacitación del personal.
<b>ELISA</b>	Precisión, sensibilidad y especificidad en general, equipos automatizados, no se requiere de entrenamiento especial.	Relativamente costoso en reactivos.
<b>Westernblot</b>	Altamente específico, confirmatorio para algunos diagnósticos.	Alto costo y se necesita entrenamiento para su interpretación.
<b>Quimioluminiscencia</b>	Alta sensibilidad, resultados rápidos, equipos automatizados de fácil manejo.	Relativamente costoso en reactivos.
<b>Reacción en cadena de la polimerasa</b>	Presenta una sensibilidad y especificidad altas, pero varían según el ensayo para el que se ha diseñado. Existen variables dentro de la técnica que dependen de las intenciones de la búsqueda.	Necesita de cebadores específicos para encontrar determinado microorganismo lo que implica un conocimiento preciso de la secuencia de nucleótidos del agente. Presencia de contaminaciones, reacciones cruzadas, costo e infraestructura.
<b>Polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción</b>	Es altamente reproducible. Muy útil en epidemiología molecular para búsqueda de mutaciones o variables.	Proceso largo, laborioso y costoso, se necesitan grandes cantidades de material genético (10µg/ensayo) y de buena calidad.
<b>Hibridación</b>	Presenta una sensibilidad y especificidad altas, pero varían según el ensayo para el que se ha diseñado.	Si existe una baja cantidad de ADN o ARN éste no se descubre.

Técnica diagnóstica	Ventaja de su uso	Desventaja de su uso
<b>FISH</b>	Bastante específica, resultados altamente confiables, no requiere de métodos de cultivo.	Algunos microorganismos producen autofluorescencia, lo que puede causar interferencia.
<b>Microarreglos</b>	Utiliza volúmenes pequeños, posibilidad de analizar simultáneamente miles de genes.	Costo relativamente elevado.

BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.

PRINCIPIOS GENERALES.

Cuadro 1. Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo.

Grupo de riesgo	Tipo de riesgo	Descripción
1	Riesgo individual y poblacional escaso o nulo	Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.
2	Riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo	Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.
3	Riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.
4	Riesgo individual y poblacional elevado	Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Los laboratorios se clasifican como sigue:

- laboratorio básico: nivel de bioseguridad 1;
- laboratorio básico: nivel de bioseguridad 2;
- laboratorio de contención: nivel de bioseguridad 3, y
- laboratorio de contención máxima: nivel de bioseguridad 4.

Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo.

Cuadro 2. Relación de los grupos de riesgo con los niveles de bioseguridad, las prácticas y el equipo.

Grupo de riesgo	Nivel de bioseguridad	Tipo de laboratorio	Prácticas de laboratorio	Equipo de seguridad
1	Básico Nivel 1.	Enseñanza básica, investigación.	TMA.	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto.
2	Básico Nivel 2.	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación.	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico.	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles.
3	Contención Nivel 3.	Diagnóstico especial, investigación.	Prácticas de nivel 2 más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional de aire.	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades.
4	Contención máxima Nivel 4.	Unidades de patógenos peligrosos.	Prácticas de nivel 3 más cámara de entrada con cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos.	CSB de clase III o trajes presurizados junto con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado.

TMA: técnicas microbiológicas apropiadas. CSB: cámara de seguridad biológica.

Cuadro 3. Resumen de los requisitos por nivel de bioseguridad.

	Nivel de bioseguridad.			
	1	2	3	4
<b>Aislamiento del laboratorio</b>	No	No	Sí	Sí
<b>Sala que pueda precintarse para ser descontaminada.</b>	No	No	Sí	Sí
<b>Ventilación:</b>				
- Flujo de aire hacia el interior	No	Conveniente	Sí	Sí
- Sistema de ventilación controlada	No	Conveniente	Sí	Sí
- Salida de aire con HEPA	No	No	Sí/No	Sí
<b>Enterada de doble puerta.</b>	No	No	Sí	Sí
<b>Cámara de cierre hermético.</b>	No	No	No	Sí
<b>Cámara de cierre hermético con ducha.</b>	No	No	No	Sí
<b>Antesala.</b>	No	No	Sí	-
<b>Antesala con ducha.</b>	No	No	Sí/No	No
<b>Tratamiento de efluentes.</b>	No	No	Sí/No	Sí
<b>Autoclave:</b>				
- En el local	No	Conveniente	Sí	Sí
- En la sala de trabajo	No	No	Conveniente	Sí
- De doble puerta	No	No	Conveniente	Sí
<b>CSB.</b>	No	Conveniente	Sí	Sí
<b>Capacidad de vigilancia de la seguridad del personal</b>	No	No	Conveniente	Sí

(1)

1. Organización Mundial de la Salud. Manual de bioseguridad en el laboratorio. 3ª ed. Ginebra, 2005.

### CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO.

El Control de Calidad en el laboratorio clínico es un sistema diseñado para incrementar la probabilidad de que cada resultado reportado por el laboratorio sea válido y pueda ser utilizado con confianza por el médico para tomar una decisión diagnóstica o terapéutica. Los procedimientos de Control de Calidad funcionan detectando los errores analíticos, idealmente cualquier error suficientemente grande para invalidar la utilidad médica de los resultados de laboratorio debe ser detectado. En la práctica, muchos procedimientos de Control de calidad operan introduciendo controles (materiales de muestras bien caracterizadas por ensayos previos) al proceso de ensayo del laboratorio y comparando los resultados de la prueba con el rango de valores esperado derivado del ensayo previo.

Ejemplo de algunas condiciones con las que se deben de cumplir en el laboratorio:

- Las instalaciones del laboratorio deben disponer de equipos de seguridad adecuados situados apropiadamente.
- Cada laboratorio debe estar equipado con instrumentos y equipos adecuados, incluyendo mesas de trabajo y campanas de extracción.
- Las condiciones ambientales, incluyendo iluminación, fuentes de energía, temperatura, humedad y presión de aire, tienen que ser apropiadas para las funciones y operaciones que se efectúen.
- Deben contar con procedimientos para la eliminación segura de los distintos tipos de residuos incluyendo desechos tóxicos (químicos y biológicos), reactivos, muestras, solventes y filtros de aire.
- Las instalaciones de almacenamiento deben estar bien organizadas para el almacenamiento correcto de muestras, reactivos y equipos. Deben mantenerse instalaciones separadas para el almacenamiento seguro de muestras, muestras retenidas, reactivos, y accesorios de laboratorio, sustancias de referencia y materiales de referencia. Las instalaciones de almacenamiento deben estar equipadas para almacenar material, si fuera necesario, bajo refrigeración (2–8°C) y congelación (-20°C) y aseguradas con llave. Todas las condiciones de almacenamiento especificadas deben ser controladas, monitoreadas y registradas. El acceso debe estar restringido al personal autorizado.
- Procedimientos apropiados de seguridad se deben elaborar e implementar rigurosamente donde se almacenan o usan reactivos tóxicos o inflamables.
- Los equipos, instrumentos y otros dispositivos deben estar diseñados, contruidos, adaptados, ubicados, calibrados, calificados, verificados, y mantenidos según sea requerido por las operaciones que se lleven a cabo en el ambiente de trabajo.

Normas que se deben de tener cuenta para un laboratorio:

- [NOM-002-STPS-2000](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, CONDICIONES DE SEGURIDAD, PREVENCIÓN, PROTECCIÓN Y COMBATE DE INCENDIOS EN LOS CENTROS DE TRABAJO.

- [NOM-005-STPS-1998](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, RELATIVA A LAS CONDICIONES DE SEGURIDAD E HIGIENE EN LOS CENTROS DE TRABAJO PARA EL MANEJO, TRANSPORTE Y ALMACENAMIENTO DE SUSTANCIAS QUÍMICAS PELIGROSAS.
- [NOM-010-STPS-1999](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, CONDICIONES DE SEGURIDAD E HIGIENE EN LOS CENTROS DE TRABAJO DONDE SE MANEJEN, TRANSPORTEN, PROCESEN O ALMACENEN SUSTANCIAS QUÍMICAS CAPACES DE GENERAR CONTAMINACIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE LABORAL.
- [NOM-018-STPS-2000](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, SISTEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y COMUNICACIÓN DE PELIGROS Y RIESGOS POR SUSTANCIAS QUÍMICAS PELIGROSAS EN LOS CENTROS DE TRABAJO.
- [NOM-026-STPS-2008](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, COLORES Y SEÑALES DE SEGURIDAD E HIGIENE, E IDENTIFICACION DE RIESGOS POR FLUIDOS CONDUCTIDOS EN TUBERIAS.
- [NOM-052-SEMARNAT-2005](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, QUE ESTABLECE LAS CARACTERÍSTICAS, EL PROCEDIMIENTO DE IDENTIFICACIÓN, CLASIFICACIÓN Y LOS LISTADOS DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS.
- [NOM-054-SEMARNAT-1993](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, QUE ESTABLECE EL PROCEDIMIENTO PARA DETERMINAR LA INCOMPATIBILIDAD ENTRE DOS O MAS RESIDUOS CONSIDERADOS COMO PELIGROSOS POR LA NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-052-SEMARNAT-1993
- [NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, PROTECCIÓN AMBIENTAL - SALUD AMBIENTAL – RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS - CLASIFICACIÓN Y ESPECIFICACIONES DE MANEJO.
- [NOM-077-SSA1-1994](#): NORMA OFICIAL MEXICANA , QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES SANITARIAS DE LOS MATERIALES DE CONTROL (EN GENERAL) PARA LABORATORIOS DE PATOLOGIA CLINICA.
- [NOM-078-SSA1-1994](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, QUE ESTABLECE LAS ESPECIFICACIONES SANITARIAS DE LOS ESTANDARES DE CALIBRACION UTILIZADOS EN LAS MEDICIONES REALIZADAS EN LOS LABORATORIOS DE PATOLOGIA CLINICA.
- [NOM-087-ECOL-1995](#): QUE ESTABLECE LOS REQUISITOS PARA LA SEPARACIÓN, ENVASADO, ALMACENAMIENTO, RECOLECCIÓN, TRANSPORTE, TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN FINAL DE LOS RESIDUOS PELIGROSOS BIOLÓGICO-INFECCIOSOS.
- [NOM-114-STPS-1994](#): SISTEMA PARA LA IDENTIFICACIÓN Y COMUNICACIÓN DE RIESGOS POR SUSTANCIAS QUÍMICAS EN LOS CENTROS DE TRABAJO.
- [NOM-007-SSA3-2011](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, PARA LA ORGANIZACIÓN Y FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS CLÍNICOS.
- [NOM-059-SSA1-2013](#): NORMA OFICIAL MEXICANA, BUENAS PRÁCTICAS DE FABRICACIÓN DE MEDICAMENTOS.
- [ISO 9001](#): SISTEMAS DE GESTION DE CALIDAD REQUISITOS.
- [ISO 17025](#): REQUISITOS QUE DEBEN CUMPLIR LOS LABORATORIOS DE ENSAYO Y CALIBRACIÓN.
- [ISO 15189](#): REQUERIMIENTOS TÉCNICOS PARA LA ACREDITACIÓN.