



Universidad Nacional Autónoma de México

FACULTAD DE QUIMICA

465

**PROYECTO PARA UN MANUAL DE LABORATORIO DE
INMUNOLOGIA APLICADA, EN LA FACULTAD DE QUIMICA**

TRABAJO MONOGRAFICO

Que para obtener el título de:

QUIMICO FARMACEUTICO BILOGO

P r e s e n t a

LIDIA FINKELSTEIN LEW

México, D. F.



1982

**EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA**



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: PROF. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA
VOCAL: PROF. SALVADOR MARTIN SOSA
SECRETARIO: PROF. CRISTINA BELTRAN AGUERRÉBERE
1er. SUPLENTE: PROF. GUADALUPE VAZQUEZ LIZARDI
2do. SUPLENTE: PROF. RODOLFO PASTELIN PALACIOS

SITIOS DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

BIBLIOTECAS DE LA FACULTAD DE QUIMICA Y DEL INSTITUTO DE
INVESTIGACIONES BIOMEDICAS, U.N.A.M.

ASESOR DEL TEMA:

PROF. Q.F.B. MA. DOLORES LASTRA AZPILICUETA

Ma. Dolores Lastra

SUSTENTANTE:

FINKELSTEIN LEW LIDIA

Lidia Finkelstein

CON TODO MI CORAZON, A MIS PADRES
MOISES Y BERTHA, CON ETERNO AGRADECIMIENTO
POR SU LUCHA CONTINUA PARA GUIARME Y
ALENTARME A LO LARGO DE MI VIDA. QUE AUN
COSECHEN MUCHISIMOS FRUTOS.

CON TODO MI AMOR, A MI ESPOSO EDUARDO,
POR SU GRAN ESTIMULO Y COMPRENSION.

A MIS QUERIDOS HERMANOS, SAMUEL, ABRAHAM,
ESTHER, REBECA Y MINA, CON MIS MEJORES DE
SEOS DE QUE CONTINUEN POR EL BUEN CAMINO
Y TENGAN MUCHAS SATISFACCIONES EN LA VIDA.

A MIS SUEGROS BORIS Y PAULINA CON MUCHO
CARIÑO POR SU APOYO.

A LA PROFESORA MA. DOLORES LASTRA, CON
TODO RESPETO Y AGRADECIMIENTO POR SU VA
LIOSA DIRECCION Y COLABORACION, QUE ME
HA PROPORCIONADO CONOCIMIENTOS DE SUMA
IMPORTANCIA PARA MI FORMACION PROFESIONAL.

A LOS MIEMBROS DEL JURADO, CON MI
SIMPATIA POR LA ORIENTACION Y ATENCION
QUE ME BRINDARON.

A MIS DEMAS FAMILIARES Y AMIGOS CON
APRECIO.

CONTENIDO

	PAG.
INTRODUCCION.	1
I. PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DEL TRABAJO DE LABORATORIO.	7
·II. INMUNOHEMATOLOGIA.	12
1. Identificación de Secretores. Determinación de Grupos Sanguíneos.	14
2. Técnica de Elución. Identificación de Anticuerpos.	24
3. Pruebas Cruzadas. Determinación de la Compatibilidad Sanguínea.	34
4. Prueba de la Antiglobulina de Coombs. Detección de Anticuerpos frente al Factor Rh (D).	44
III. COMPLEMENTO.	57
1. Determinación Cuantitativa del Complemento Total 50% Hemolítico.	59
2. Titulación de Anticuerpos Anti-Nucleares por Fijación de Complemento.	69
IV. LINFOCITOS.	83
1. Inmunocitoadherencia. Formación de Rosetas E.	85
2. Separación de Linfocitos T y B en Sangre Periférica.	94
3. Cuantificación de Células Formadoras de Anticuerpo.. Modificación de la Técnica de Jerne.	105
V. INTERACCION ANTIGENO-ANTICUERPO.	113
1. Contrainmunolectroforesis. Investigación de Anticuerpos frente a Entamoeba histolytica.	114
2. Electroinmunodifusión. Cuantificación de Seroalbúmina Humana.	125

	PAG.
3. Hemaglutinación Indirecta. Titulación de Anticuerpos frente a Tiroglobulina.	135
VI. APLICACION DE DIFERENTES TECNICAS INMUNOLOGICAS COMO AUXILIARES DIAGNOSTICOS.	148
1. Fijación en Superficie y Aglutinación en Placa. Reacciones Febriles.	149
2. Preparación de una Autovacuna Bacteriana.	160
3. Fagocitosis de Nitroazul de Tetrazolio. Diagnóstico de Granulomatosis Crónica.	171
4. Aglutinación de Anticuerpos Heterófilos en Papel. Diagnóstico de Mononucleosis Infecciosa.	179
VII. TECNICAS ESPECIALES.	189
1. Inmunofluorescencia (IF).	190
2. Radioinmunoanálisis (RIA).	197
3. Enzimoimmunoanálisis (EIA).	207
VIII. ORGANIZACION DE UN LABORATORIO DE INMUNOLOGIA CLINICA.	216
APENDICE.	
1. Equipo Mínimo Requerido en un Laboratorio de Prácticas de Inmunología.	222
2. Abreviaturas Utilizadas en el Manual.	223

INTRODUCCION

La Inmunología ha avanzado en tal forma en las dos últimas décadas, que son pocos los campos en los cuales no puede contribuir. A medida que una cantidad masiva de nuevo material científico se acumula en esta área, es difícil estar al corriente de todos los progresos en las investigaciones desarrolladas.

Este manual ha sido diseñado con el objetivo de que el alumno de la carrera de Q.F.B., se familiarice y practique varias técnicas inmunológicas básicas, cuyo dominio es importante por los múltiples avances y aplicaciones que está teniendo este campo en la actualidad, en diversas instituciones hospitalarias y de investigación, y por su estrecha relación con otros cursos que se imparten en la licenciatura, tales como Inmunología General, Hematología, Análisis Clínicos Bacteriológicos, Virología, Química Legal y Vitaminas y Hormonas entre otros donde quedan incluidas varias determinaciones inmunológicas. Ha sido desarrollado como el aspecto práctico del curso de Inmunología Aplicada. Se describen aquí, técnicas que son producto de la contribución y experiencia de los profesores que han impartido e imparten los cursos.

Las prácticas establecidas en este manual incluyen varios puntos que han sido desarrollados con objeto de facilitar el trabajo, comprensión, aprovechamiento y desarrollo de habilidades técnicas y científicas por parte del alumno. Estos puntos son:

El objetivo, que proporciona al alumno información sobre las finalidades que se persiguen con la práctica a desarrollar.

Las generalidades, que introducen al alumno en el tema a tratar. Aquí se establece el origen de la técnica, se defi

ne como se lleva a cabo en forma general la misma, subrayando ciertas condiciones importantes en su ejecución, se analiza su sensibilidad comparándola con otros métodos inmunológicos que se usan con la misma finalidad, se describen las aplicaciones que tiene, y se señalan las principales características de los compuestos y funciones que se investigan con el método.

El fundamento, que es un resumen de la técnica, donde se orienta al alumno sobre los pasos que se requieren realizar en la prueba.

La técnica propiamente dicha, que incluye los reactivos, material, equipo y metodología, cada uno tratado separadamente para agilizar el trabajo en el laboratorio. El alumno antes de empezar la práctica, conoce el material que requiere para elaborarla, y puede solicitarlo con anticipación; el profesor repasa rápidamente qué reactivos se necesitan, y reconoce aquellos que requieren preparación previa, y el personal encargado del equipo, lo tiene listo para su uso antes de que los alumnos realicen la práctica. La metodología explica en forma ordenada, cada uno de los pasos que deben llevarse a cabo, analizando con esquemas y tablas, los puntos que representan mayor dificultad, para facilitar la comprensión y evitar errores.

Los resultados, que especifican cómo deben reportarse los datos obtenidos, qué criterios se deben seguir para tal efecto, y dónde se proporcionan cuando es posible, cuadros para reportar en forma ordenada los mismos.

El cuestionario, que permite ejercitar y enfocar la atención del alumno en la técnica desarrollada, pues contiene preguntas que requieren para su respuesta, análisis, criterio e investigación previa del tema tratado, el cual necesita actualizarse periódicamente.

La discusión, que analiza las ventajas, desventajas y limitaciones de la técnica, ciertas condiciones y cuidados que se deben tener en la elaboración de la misma, así como la utilidad de sus aplicaciones.

La bibliografía, que permite profundizar en los temas tratados, al proporcionar información general y específica para realizar investigaciones posteriores. Como constantemente se editan nuevos artículos y ediciones de libros donde se tratan los diferentes temas, es conveniente revisar cada cierto tiempo este nuevo material, para utilizarlo en la continua actualización del manual.

Este manual comprende ocho capítulos, entre los cuales han quedado convenientemente distribuidas las prácticas, e incluyen:

I. Principios Fundamentales del Trabajo de Laboratorio.- Aquí se establecen las condiciones para desempeñar el trabajo en el laboratorio, evitando los posibles peligros de accidentes, y realizar las prácticas correctamente.

II. Inmunoematología.- Comprende la Prueba de Identificación de Secreteres, la Técnica de Elución, las Pruebas Cruzadas y la Prueba de la Antiglobulina de Coombs, todas utilizadas en los bancos de sangre, de ahí el enfoque que se les ha dado, sin embargo su uso no está restringido a este campo, ya que tienen otras aplicaciones. En este capítulo deben quedar incluidas también las tipificaciones de los grupos sanguíneos ABO, Rh y otros anticuerpos irregulares, pero en la actualidad estas determinaciones se realizan en los laboratorios de Inmunología General y Hematología, por lo que no se incluyen en este laboratorio que comprende temas tan variados.

III. Complemento.- Este capítulo comprende dos pruebas básicas que son la Determinación Cuantitativa del Complemento Total 50% Hemolítico y la Fijación de Complemento aplicada en la "Titulación de Anticuerpos Anti-Nucleares". - Existen muchas determinaciones relacionadas con los componentes del complemento, que por ser más específicas no han quedado incluidas en este manual.

IV. Linfocitos.- Comprende la Inmunocitoadherencia, la Separación de Linfocitos T y B en Sangre Periférica y la Cuantificación de Células Formadoras de Anticuerpo, todas determinaciones que requieren ser dominadas por el alumno, para facilitar su comprensión de la importancia que tienen estos aspectos de la Inmunología.

V. Interacción Antígeno-Anticuerpo.- En este capítulo se tratan metodologías de precipitación y aglutinación. Quedan aquí incluidas, la Contrainmunolectroforesis, La Electroinmunolectroforesis y la Hemaglutinación Indirecta. La técnica de Precipitación Cuantitativa no ha sido desarrollada en este manual, debido al tiempo que requiere su ejecución, sin embargo, sería conveniente discutirla en un seminario.

VI. Aplicación de Diferentes Técnicas Inmunológicas como - Auxiliares Diagnósticos.- Se han colocado aquí las técnicas de Fijación de Superficie y Aglutinación en Placa para la determinación de las Reacciones Febriles, la Preparación de una Autovacuna Bacteriana de aplicación terapéutica, la Fagocitosis de Nitroazul de Tetrazolio para el diagnóstico de Mononucleosis Infecciosa. Cada una de estas pruebas enfocan importantes aspectos de la respuesta inmune y su utilidad diagnóstica.

VII. Técnicas Especiales.- Aquí se analizan las generalidades de los modernos inmunoanálisis que utilizan reactivos

marcados con compuestos fluorescentes, radioactivos y enzimáticos, que por requerir equipo y reactivos muy sofisticados, aún no están a disposición del laboratorio de enseñanza de Inmunología, y por lo cual se recomienda realizar visitas a instituciones donde se llevan a cabo estas pruebas, para que el alumno pueda familiarizarse con la instrumentación y los procedimientos empleados.

VIII. Organización de un Laboratorio de Inmunología Clínica.- En este capítulo se describe como debe funcionar un laboratorio de Inmunología Clínica moderno, qué determinaciones deben quedar incluidas en cada área del mismo, y se subraya la importancia del control de calidad en este laboratorio, analizando algunas dificultades que presenta este control, con objeto de que el alumno palpe el panorama actual.

En la selección de los temas y su número, se ha tomado en consideración la duración semestral del curso, y el tiempo de cuatro horas semanales del cual se dispone para llevar a cabo cada uno. Las prácticas han sido elaboradas, considerando un grupo de cuarenta alumnos, pero como esta cifra está sujeta a variaciones, la formación de equipos de trabajo con un determinado número de alumnos, se debe establecer de acuerdo al criterio del profesor, en cuanto a la cantidad de reactivos, material y equipo con los cuales cuenta el laboratorio.

En ciertas técnicas, por indicación del profesor, el alumno debe dedicar tiempo extra para preparar previamente ciertos reactivos y condiciones de trabajo, o para realizar lecturas posteriores de las pruebas que así lo requieren.

Es importante hacer notar que este manual no está restringido en su uso como ejercicios del laboratorio de Inmunología Aplicada, ya que las técnicas incluidas en él, pue-

den aplicarse en laboratorios clínicos y de investigación, proporcionándose bibliografía para quienes deseen profundizar más en los temas expuestos. Estamos concientes de que el manual debe estar sujeto a una revisión constante, para tener un manual actualizado.

PRINCIPIOS FUNDAMENTALES DEL TRABAJO DE LABORATORIO

Además de realizar lo mejor posible los distintos análisis de laboratorio, el alumno debe recordar constantemente las posibles causas de accidentes, los eventuales peligros y las medidas más eficaces para disminuir las probabilidades de lesiones y daños materiales..

Los posibles peligros en el trabajo de laboratorio son:

- a) Incendio o explosión al utilizar solventes inflamables.
- b) Reactivos venenosos, corrosivos y cáusticos.
- c) Quemaduras y escaldaduras, incluyendo choques eléctricos.
- d) Laceraciones por vidriería rota, cuchillas de microtomo, etc.
- e) Infecciones, virosis o parasitosis.
- f) Mordeduras de animales.
- g) Peligros de radiación.

Por lo tanto, deben tomarse medidas de seguridad al respecto, dependiendo del tipo de material, reactivos y técnicas que se van a utilizar en determinada práctica.

El alumno debe cumplir los siguientes requisitos para realizar el trabajo de laboratorio con precaución:

1. Utilizar una bata de laboratorio siempre; esta debe ser lavada después de cada experimento.
2. Atender cortadas y abrasiones antes de entrar al laboratorio; reportar cualquier herida adquirida en el laboratorio al profesor para tratamiento.
3. Antes de entrar y al salir del laboratorio, lavar las manos con jabón o solución desinfectante.

4. No colocar en la boca ni dedos, ni plumas y lápices; las etiquetas se mojan con agua, no con saliva.

5. No se deben introducir ni alimentos, ni bebidas al laboratorio y no se debe fumar.

6. El área de trabajo debe estar libre de materiales extraños; como son papeles, libros, ropa y bolsas y cualquier equipo o material de vidrio no necesarios.

7. El área de trabajo que pueda presentar contaminación biológica, se debe desinfectar al iniciar y finalizar el experimento, para no contaminar accidentalmente a otros que utilicen el laboratorio después.

8. Los frascos de solvente que permanezcan sobre la mesa del laboratorio, deben contener la menor cantidad posible para las necesidades del trabajo.

9. Antes de abrir un frasco de cualquier solvente inflamable, se verifica que no se encuentre en un radio de tres metros ningún mechero prendido.

10. Los solventes inflamables no deben usarse en lugares cerrados, en donde los vapores pueden acumularse hasta formar con el aire mezclas explosivas.

11. Las soluciones que contienen solventes, nunca deben caer sobre mechero Bunsen.

12. El mechero Bunsen debe estar limpio, pues de lo contrario pueden producirse incendios en caso de inflamarse el chorro interno de gas, fundiéndose el tubo de hule y prendiéndose el tanque de gas.

13. El olor del gas suele ser suficiente para detectar una fuga, la cual se puede localizar usando agua jabonosa.

14. Los baños de agua de acero inoxidable con calentamiento eléctrico, deben trabajar preferentemente con agua destilada para evitar los cortos circuitos por oxidación.

15. Al verter ácidos fuertes para hacer diluciones, deben usarse guantes de caucho; para evitar quemaduras se debe verter lentamente, empleando frascos con picos vertedores. Para transferir ácidos fuertes, a forma más adecuada es emplear alguna de las distintas bombas de plástico que existen en el mercado. Siempre debe añadirse el ácido al agua, mezclando frecuentemente.
16. Para preparar soluciones de bases fuertes, deben tomar se las mismas precauciones que para los ácidos fuertes.
17. Todos los frascos de laboratorio deben rotularse correctamente, particularmente en el caso de soluciones de compuestos venenosos.
18. Cualquier manipulación que produzca un vapor tóxico, debe realizarse bajo la campana.
19. Nunca se debe manejar cristalería u otros objetos con las manos desnudas sino tiene la certeza de que están fríos. Se debe disponer de equipo para un manejo seguro de los utensilios calientes, como son los guantes de asbesto, pinzas para tubo, vasos y crisoles.
20. No se debe calentar la parte inferior de un líquido en un tubo de ensayo, para evitar una proyección. El verter líquidos calientes en recipientes fríos, puede provocar la ruptura del vidrio y derrame del líquido. Cuando se utilizan frascos con pared delgada, siempre debe utilizarse una tela metálica con asbesto, y para disminuir el peligro de proyección por ebullición violenta, deben agregarse canicas de cuarzo o piedras de ebullición en el recipiente, antes de calentar.
21. Un aparato eléctrico nunca debe ser manejado con las manos mojadas, o estando de pie sobre un piso húmedo. Las conexiones eléctricas no deben estar mal hechas o ser insuficientes para la corriente utilizada. Nunca deben realizarse

intentos de reparar aparatos eléctricos sin antes desconectarlos.

22. No debe emplearse mucha fuerza al montar un aparato de cristal, ni al conectar tubos de vidrio en tapones de caucho. En una centrífuga, los tubos soportan fuerzas considerables; si están hendidos o fisurados, se romperán a velocidades muy pequeñas. Los tubos de centrífuga de todos tamaños deben ajustar lo mejor posible a los portatubos de metal; los tubos de fondo redondo resisten mejor que los cónicos y para velocidades muy altas se necesitarán tubos de plástico.

23. Si se intenta transportar varios aparatos de cristal al mismo tiempo, es posible que se rompan. Los artículos de vidrio mal colocados pueden romperse.

24. El grado de peligro para el laboratorista que trabaja con material microbiológico depende de la naturaleza de los microbios y de lo depurado de la técnica. Algunas bacterias, por ejemplo las brucelas, tienen un poder infectante tan elevado que aún con una buena técnica persiste cierto peligro y pueden necesitarse ciertas precauciones adicionales como la vacunación. En casi todos los casos, una buena técnica basta para garantizar la seguridad.

25. No se debe tirar ningún residuo de material infectante en el lavadero. El instructor de laboratorio debe proporcionar recipientes para desechar dicho material, así como también charolas para colocar pipetas y portaobjetos con material contaminante.

26. Si se derraman cultivos en la mesa o en el piso, se debe dar aviso inmediato a los alumnos cercanos, y notificar al instructor para que el área de contaminación sea desinfectada convenientemente.

27. La mejor forma para aprender a manejar correctamente los animales de laboratorio, es la instrucción práctica directa.

Si un animal ha sido inyectado con material patológico y produce una lesión por mordedura o arañazo, debe reportarse de inmediato y tratarse como es debido, cualquier herida por pequeña que sea.

BIBLIOGRAFIA

1. Boyd F. y Hoerl G.B. Laboratory Manual to Accompany Basic Medical Microbiology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Little, Brown and Co. 1981.
2. Ellis G. y Riches J. N. Safety and Laboratory Practice. 1a. edición. Great Britain. Ed. Macmillan. 1978.
3. Lynch J. M. y col. Métodos de Laboratorio. 2a. edición. México. Ed. Interamericana. 1972.

INMUNOHEMATOLOGIA

La inmunohematología es la subespecialidad más antigua de la inmunología. Su origen se remonta a 1875, cuando Landois observa que los eritrocitos de especies animales distintas, aglutinan al mezclarse "in vitro"; la primera enfermedad donde se descubrió un mecanismo inmunológico implicado en la patología, fue la anemia hemolítica autoinmune.

Las transfusiones sanguíneas, anteriores a 1900, generalmente ocasionaban la muerte de los receptores; Landsteiner explicó el motivo de este fenómeno, al descubrir el sistema ABO. El gran aumento de la terapia de transfusión, se debe al conocimiento de los sistemas antígeno-anticuerpo del sistema sanguíneo, que se encuentran bajo control genético y tienen implicaciones bioquímicas, inmunológicas y antropológicas.

Los tejidos de cada individuo en una población exogámica (como la del humano), poseen una composición única de antígenos, que hace imposible el trasplante de tejidos de una persona a otra, cuando el receptor es inmunológicamente competente. Afortunadamente la complejidad antigénica de los eritrocitos humanos, es menor que en los demás tejidos, y esto permite la posibilidad de transfundirlos sin utilizar terapia inmunosupresora. Se han descubierto cerca de 300 antígenos sanguíneos, de los cuales aproximadamente 50 están presentes en grandes cantidades.

En general, las aplicaciones prácticas de la serología de los grupos sanguíneos, se puede clasificar así:

1. Transfusión de sangre.
 - a) Tipificación de grupos.
 - b) Determinación de compatibilidad.
 - c) Identificación de anticuerpos encontrados en pruebas de compatibilidad, o después de reacciones transfusionales.

2. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad hemolítica del recién nacido.

3. Investigación de pacientes que sufren anemia hemolítica adquirida.

La tipificación de sangre, las pruebas de compatibilidad y los procedimientos inmunohematológicos son las técnicas más usadas. En la mayoría de los hospitales, las necesidades técnicas del servicio de transfusión están limitadas a obtener sangre compatible para los pacientes.

IDENTIFICACION DE SECRETORES. DETERMINACION DE
GRUPOS SANGUINEOS

Objetivo: Aplicar el fundamento para la identificación de secretores, analizando la importancia de su estudio. Demostrar la presencia de sustancia H en saliva y establecer la diferencia entre las sustancias de secreciones y las de grupos sanguíneos.

Evaluar las propiedades de las lectinas, aplicándolas en la determinación de secretores por inhibición de la hemaglutinación.

Generalidades: Las sustancias A, B y H de grupos sanguíneos no sólo se presentan en los eritrocitos, muchas otras células contienen estos antígenos en su membrana (8). Los antígenos A, B y H existen en dos formas: a) glicolípidos solubles en alcohol que se encuentran en la membrana de los eritrocitos y otras células del organismo, con excepción de las del cerebro, y que no están presentes en secreciones y, b) polisacáridos hidrosolubles, que se extraen fácilmente de los eritrocitos de secretores (6).

Se presentan diferencias en la concentración de las sustancias liposolubles en los distintos órganos. Las concentraciones más elevadas se han encontrado en las glándulas submaxilares, en el esófago, en el estómago, en el páncreas y en la vesícula. Se encuentran cantidades menores en las glándulas parótidas, suprarrenales, pulmón, hígado y riñón. Finalmente, se han observado trazas por ejemplo en testículos y en el bazo (7).

Las sustancias A, B y H de secreciones se han encontrado en secreciones normales como son la saliva, el jugo gástrico, bilis, orina, fluido amniótico y sudor, así como en secreciones patológicas, como los fluidos pleural, pericar-

dial, de ascitis, hidrocele y fluido pseudomicinoso de quiste de ovario; no aparecen en fluido cerebroespinal (5).

El fenómeno de secreción es una característica mediada por el control directo de un par alelico de genes Mendelianos; Se es el gene secretor y se el gene no secretor. El gene Se es dominante y cuando esta presente en estado homocigoto o heterocigoto, presenta la capacidad de secretar las sustancias A, B o H hidrosolubles, dependiendo del grupo sanguíneo del individuo (10).

Los no secretores están representados por el grupo homocigoto con genotipo sese.

Este es un sistema independiente de genes sin unión con los genes ABO, pero si con una íntima asociación (4).

Entre europeos y americanos, la frecuencia de los secretores oscila entre un 77 y 78%, y los no secretores constituyen un 22-23% de la población. La única excepción son los indios norteamericanos y los aborígenes australianos (8).

Fue Schiff en 1927, quien demostró que la reacción de heteroaglutinación de eritrocitos humanos grupo A o A₁B, absorbidos con suero bovino, se inhibía específicamente por saliva humana de secretores del grupo 0 (7).

Watkins y Morgan en 1948 dividieron el antisuero de secretores en dos grupos. Los que se inhibieron por las sustancias probadas se designaron sueros anti-H, y la sustancia correspondiente se designó como sustancia H, para enfatizar - que esta no era producto del gene 0, y para establecer que era inmunológicamente distinta de cualquier sustancia eritrocítica (7).

El estado de secretor se puede demostrar por la precipitación directa, que es un método relativamente insensible, no aplicable a pruebas de rutina por requerir de un antisue-

ro muy potente, como sería el heteroantisuero de conejo frente a eritrocitos humanos, o el isoantisuero humano inmune - (11).

También se demuestra por la inhibición de la aglutinación, que es una de las pruebas serológicas más sensibles al alcance del inmunólogo; permite perfectamente la demostración de las sustancias ABH en fluidos corporales y en extractos salinos de tejidos, pudiendo detectar desde 0.00025 a - 0.0005 μ g, especialmente si se utiliza suero no inmune anti-A o anti-B (8).

Ciertas secreciones de personas del grupo A, como el jugo gástrico, la saliva y el semen, contienen enormes cantidades de antígeno A, comparado con la actividad A de los eritrocitos del individuo (8).

La saliva es el fluido de elección para determinar el estado de secretor, pues contiene grandes cantidades de estas sustancias de grupo y es fácilmente accesible. Si las sustancias están ausentes de la saliva, lo estarán también de otras secreciones (7).

Las lectinas son proteínas con sitios específicos de unión para carbohidratos, por lo cual reaccionan con glicoproteínas o glucolípidos en solución o en membranas celulares. Producen variados efectos en sistemas biológicos, incluyendo la aglutinación preferencial de eritrocitos A, B H, M, N y de las células transformadas, malignas y embrionicas. Sirven como reactivos para la detección, aislamiento y caracterización de materiales que contienen carbohidratos, incluyendo a las sustancias de los grupos sanguíneos. Por sus propiedades y la facilidad de purificación han estado sujetas a extensas investigaciones, en especial en esta última década. Stillmark las descubrió en el año de 1888, al observar que los frijoles de castor, contenían un principio tóxico que aglutinaba eritrocitos humanos y animales.

Las lectinas se encuentran ampliamente distribuidas entre los organismos vivientes, pero se extraen con mayor frecuencia de las semillas y otras partes de plantas leguminosas. Además se han encontrado en hongos, bacterias, invertebrados, peces, en mieloblastos de pollo y en la membrana plasmática de células de conejo o hígado bovino (3).

Es mejor trabajar con preparaciones puras de lectinas, porque los materiales crudos pueden contener aglutininas con especificidades de azúcares diferentes, o estar contaminados con enzimas u otros materiales que pueden interferir con la unión entre la lectina y su receptor de carbohidrato específico. Hasta la fecha, se han aislado cerca de 50 lectinas en forma homogénea (3).

Los antígenos ABH actúan como potentes antígenos de transplante en el hombre (9).

Se han observado alteraciones del fenotipo de eritrocitos, en una variedad de condiciones malignas. En la leucemia se ha observado supresión del antígeno A. Se ha reportado que los individuos del grupo A son más susceptibles a cálculos, cirrosis del hígado, tumores de las glándulas salivales, estómago, páncreas y ovario, infarto al miocardio y diabetes mellitus. La úlcera duodenal es más común en los no secretores (10).

Fundamento: Al añadir lectina anti-H que tiene una función similar a la de un anticuerpo, a un tubo que contiene saliva, que es una secreción con un alto contenido de antígeno H en los secretores, se lleva a cabo una unión específica antígeno-anticuerpo, que inhibe la aglutinación que debería producirse al añadir posteriormente eritrocitos grupo O que contienen también sustancia H, detectándose así el estado secretor. Si la saliva de prueba pertenece a un no secretor, se obtiene una aglutinación visible, resultado de

la reacción de la lectina anti-H, con el antígeno H de la superficie de los eritrocitos O.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Lectina anti-H (extracto de la semilla de *Ulex europaeus* o semilla de enebro), 3 gotas.

Suspensión de eritrocitos lavados tipo O al 2% en solución salina isotónica, 6 gotas.

Saliva humana, 4 a 5 ml.

Solución salina isotónica, aproximadamente 20 ml.

Material:

1 tubo de ensaye de 16 x 150 mm.

8 tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

1 embudo.

2 pipetas graduadas de 5 ml.

4 tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

8 pipetas capilares.

1 gradilla.

Equipo:

Centrífuga.

Baño a temperatura de 90-100°C.

METODOLOGIA

1. Colectar la muestra de saliva en el tubo de ensaye de 16 x 150 mm. con un embudo, obteniendo 4 a 5 ml. Colocar inmediatamente el tubo en un baño de agua a 90-100°C durante 10 minutos para inactivar la saliva, porque tanto la de secretores como la de no secretores, contiene enzimas bacterianas producidas por microorganismos de la familia Bacillaceae, que son capaces de descomponer las sustancias ABH. Cen

trifugar unos minutos a 2500-3000 rpm, para separar el coágulo que se formó al calentar; decantar el sobrenadante que tiene el aspecto de un líquido opalescente y colocarlo en el refrigerador hasta el momento de realizar la prueba. Para conservarlo por tiempo prolongado, puede congelarse.

2. Preparar una serie de diluciones de la saliva; para ello depositar en cuatro tubos de ensaye de 13 x 100 mm., 3.0 ml de solución salina isotónica; llevar a cabo una dilución seriada, añadiendo al primer tubo 1.0 ml de saliva, mezclar perfectamente, tomar 1.0 ml de la mezcla y pasarlo al segundo, repetir la operación al tercero y al cuarto; de esta manera se tendrán las siguientes diluciones: 1:4, 1:16, 1:64 y 1:256.

3. En una gradilla apropiada, colocar 6 tubos de ensaye de 12 x 75 mm., en el primer tubo colocar una gota de saliva sin diluir, y en los cuatro siguientes, una gota de cada una de las diluciones anteriores; en el sexto tubo depositar una gota de solución salina isotónica, este tubo nos servirá como testigo de la aglutinación.

4. Preparar una dilución de 1:4 de la lectina anti-H; para esto, en un tubo de 12 x 75 mm., depositar tres gotas de la lectina y añadir 9 gotas de solución salina isotónica, mezclar perfectamente y añadir una gota a cada uno de los tubos que contienen saliva y al testigo.

5. Mezclar perfectamente el contenido de los tubos y dejar los reposar a temperatura ambiente durante exactamente 10 minutos.

6. Añadir 1 gota de la suspensión al 2% de eritrocitos del grupo 0, a cada uno de los tubos.

7. Mezclar y dejar reposar durante 5 minutos a temperatura ambiente. Centrifugar a 1000 rpm durante 1 minuto, a 3400 rpm durante 30 seg.

8. Agitar suavemente los tubos que contienen a los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación macroscópica.

Resultados:

La saliva de un individuo contiene sustancias H si es secretor; esta sustancia H neutraliza a la lectina anti-H, e inhibe la aglutinación de los eritrocitos tipo O que son añadidos en la segunda parte de la reacción. Se toma como punto final, la dilución más alta de la saliva que muestre inhibición total de la aglutinación de los eritrocitos. El testigo deberá mostrar aglutinación franca.

Sin diluir	Aglutinación
1:4	
1:16	
1:64	
1:256	
Testigo	

- = No hay aglutinación.
- + = Aglutinación dudosa.
- (+) = Trazas de aglutinación: pocos aglutinados finos que comprenden menos del 50% de las células.
- + = Aglutinación ligera: muchos aglutinados finos sin células libres.
- ++ = Aglutinación moderada: varios aglutinados de pequeños a regulares sin células libres.
- +++ = Aglutinación fuerte: pocos aglutinados grandes sin células libres.
- ++++ = Aglutinación muy fuerte (máxima): un acúmulo sólido de células.

Por lo tanto, el individuo estudiado es: _____

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la composición química de las sustancias A, B y H?
2. ¿Qué diferencias existen entre los grupos sanguíneos A₁ y A₂?
3. Explique el fenómeno Bombay.
4. Mencione 3 lectinas que son utilizadas en la tipificación de grupos sanguíneos.
5. ¿Por qué no debe utilizarse goma, dulce o drogas salivatorias para obtener la muestra de saliva?
6. ¿Cuál es el objetivo de hacer diluciones de la saliva?
7. ¿En la práctica, que finalidad tiene el uso de lectina anti-H?
8. ¿Qué son las autoaglutininas, y como pueden ser eliminadas?
9. Explique el significado de panaglutinación.
10. ¿Cuáles serían las aplicaciones médico-legales de esta prueba?

DISCUSION

La técnica de inhibición de la aglutinación aplicada en la determinación de secretores, es sencilla y económica; el material y los reactivos son muy accesibles. Requiere mayor tiempo de elaboración, en comparación con la tipificación de grupos sanguíneos por aglutinación directa, pero resulta mucho más sensible.

Los grupos sanguíneos A y B, pueden ser determinados con el mismo procedimiento, pues la saliva contiene grandes concentraciones de estos antígenos.

Es conveniente utilizar saliva en esta determinación, porque es una secreción muy accesible, pero deben considerarse las precauciones de su procesamiento.

La sensibilidad de la inhibición va a depender fundamentalmente de la fuerza del antisuero. Se utilizan lectinas por la propiedad que presentan de combinarse con polisacáridos en forma muy específica. La lectina que se va a utilizar en la técnica, debe ser titulada previamente, porque las aglutininas presentes en los extractos de lectina, pueden ser absorbidas por los eritrocitos y ocasionar aglutinación inespecífica, lo cual representa una desventaja y por lo cual, es recomendable absorber el suero del paciente con sus propias células de 0 a 5°C.

Los eritrocitos que se usan en la prueba requieren ser frescos, para evitar el fenómeno de panaglutinación.

BIBLIOGRAFIA

1. Bellanti J. A. Inmunología II. 1a. edición. México. Ed. Interamericana. 1980.
2. Eisen H. N. Inmunología. 1a. edición. España. Ed. Salvat. 1979.
3. Kabat A. E. y Pereira. E. M. Immunochemical studies on Lectins and their application to the Fractionation of Blood Group Substances and Cells. CRC Crit. Rev. Immunol., 7:33, 1979.
4. Medina A. R. Inmunohematología Aplicada al Banco de Sangre. 1a. edición. México. Ed. Sociedad Mexicana de Hematología. 1979.
5. Mourant A. E., Kopec A. C. y Domaniewska S. K. Blood groups and diseases. 1a. edición. Great Britain. Ed. Oxford University Press. 1978.

6. Race R. R. y Sanger R. Blood Groups in Man. 6a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
7. Rose R. N. y Bigazzi E. P. Methods in Immunodiagnosis. 1a. edición. U.S.A. Ed. John Wiley & Sons. 1973.
8. Todd C. J., Sanford H. S. y Davidsohn D. B. Clinical Diagnosis and Management. 17a. edición. U.S.A. Ed. W. B. Saunders Company. 1979.
9. Watkins M. W. Blood Groups Substances. Science, 152: 172, 1966.
10. Wintrobe M. M. Clinical Hematology. 7a. edición. -- U.S.A. Ed. International Copyright Union. 1974.
11. Zmijewski C. M. Immunohematology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Prentice Hall Inc. 1978.

TECNICA DE ELUCION. IDENTIFICACION DE
ANTICUERPOS

Objetivo: Analizar el fundamento de la técnica de elución y aplicarla en la separación de anticuerpos anti-A del sistema ABO, presentes en un suero del grupo O, previa absorción con eritrocitos del grupo A, utilizando la elución por calor y la elución por precipitación con alcohol. Demostrar por aglutinación la presencia de anticuerpos en el eluido.

Señalar las aplicaciones de la técnica, y evaluar las ventajas y limitaciones de la misma.

Generalidades: Se denomina elución, a la extracción del anticuerpo absorbido a los eritrocitos, transformándolo en variedad libre, en un medio de suspensión adecuado. Posteriormente, la suspensión de elución puede estudiarse frente a una serie de eritrocitos testigo (1).

La elución se lleva a cabo, para demostrar la presencia de anticuerpos, lograr su identificación, y poderlos liberar y recuperar, cuando ya han formado un complejo antígeno-anticuerpo con los eritrocitos (6). Es una herramienta valiosísima para la identificación de cada anticuerpo, en una mezcla de anticuerpos con especificidades diferentes, y para el estudio de sus propiedades, como es la capacidad de combinación de diversos tipos de anticuerpos (3). Es particularmente útil para la recuperación de anticuerpos provenientes de eritrocitos que se han sensibilizado "in vivo", en lactantes con anemia hemolítica del recién nacido, en pacientes con enfermedades autoinmunes y también se lleva a cabo para la demostración e identificación de variantes débiles de los grupos A y B (1). En la serología de la medicina forense, ha sido empleada con éxito para el descubrimiento de antígenos en tinciones de sangre (7).

Existen varios métodos para liberar al anticuerpo del antígeno. El método de elección depende del sistema de grupos sanguíneos que esté siendo estudiado (3).

Hughes Jones y col. investigaron en 1963, la eficiencia de diversas técnicas para la elución de anticuerpos IgG y anti-D (4). Su modificación de la técnica de Rubin, en la cual se incubaba una mezcla de éter-eritrocitos a 37°C durante 30-60 minutos, resulta ser tan útil como lo es el método de elución en el cual el anticuerpo es recuperado de los eritrocitos, bajo condiciones de pH reducido (8).

Los anticuerpos del sistema ABO son eluidos con facilidad, empleando un método de elución por calor, que ha sido desarrollado a partir del método original de Landsteiner y Miller (1925) (2). Este método también es adecuado para -- eluir anticuerpos anti-Rh, y debido a su simplicidad, a menudo constituye la técnica de elección para todos tipos de anticuerpos (1).

En la técnica de elución por calor, los eritrocitos lavados con los anticuerpos insertados, se colocan en un baño de agua durante 5-10 minutos con una pequeña cantidad de solución salina, añadida de poca proteína. Por lo general se selecciona una temperatura de 55°C, pero la temperatura óptima para la elución está influenciada considerablemente, por el tipo de inmunoglobulina y por la especificidad del anticuerpo, y sobre todo, por la potencia de su capacidad de combinación con el antígeno (2).

La proporción entre el antígeno y el anticuerpo, afecta la captación del anticuerpo por el antígeno y por ende su elución, que está también influenciada por el número y acceso de los sitios antigénicos, y por el equilibrio de la reacción. Es necesario determinar la proporción óptima de suero/eritrocitos en los experimentos de elución; a menudo son ade

cuados cocientes de suero/eritrocitos entre la gama de 2:1 y 5:1 (1). *

No existe ventaja al emplear suspensiones demasiado - concentradas de eritrocitos, y no hay recuperación completa del anticuerpo absorbido al efectuar la elución. Nuevas eluciones a partir de los mismos eritrocitos sensibilizados, a menudo porporcionan eluados segundos, terçeros y hasta - cuartos, que contienen anticuerpos activos (7).

Fundamento: Al hacer reaccionar el suero de un individuo perteneciente al grupo 0, con eritrocitos del grupo A, estos absorben a las aglutininas anti-A, que pueden separarse mediante la técnica de elución en calor, que se realiza suspendiendo los eritrocitos en solución salina, calentando, y centrifugando para separar los eritrocitos del eluido que contiene los anticuerpos libres; también pueden ser separados por elución con precipitación en alcohol, donde los eritrocitos sensibilizados se congelan y descongelan, añadiendo etanol frío para precipitar completamente los anticuerpos presentes, centrifugando finalmente para separar los anticuerpos precipitados, que quedan adheridos al tubo. Finalmente los eluidos se prueban con los eritrocitos del grupo correspondiente, demostrándose por aglutinación la reacción antígeno-anticuerpo.

ELUCION POR MEDIO DE CALOR
(Método de Landsteiner Miller)

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Suero procedente de sangre del grupo 0, 5.0 ml.
Eritrocitos del grupo A, lavados y centrifugados, 1.0 ml.

Suspensión al 2% de eritrocitos del grupo A, previamente lavados, 0.5 ml.

Suspensión al 2% de eritrocitos del grupo B, previamente lavados, 0.25 ml.

Solución salina isotónica, 50 ml.

Material:

2 tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

4 pipetas capilares.

1 tubo para centrifuga de 10 ml, graduado.

Equipo:

Baño a temperatura de 56°C.

Centrifuga.

METODOLOGIA

1. En un tubo de centrifuga mezclar 5.0 ml de suero procedente de sangre tipo 0, con 1.0 ml de eritrocitos grupo A, lavados una vez con solución salina isotónica. Dejar actuar el suero durante 5 minutos; agitando suavemente de vez en cuando.
2. Centrifugar unos minutos a 1000 rpm y desechar el sobrenadante. Lavar el sedimento de eritrocitos y 3 veces con solución salina isotónica para eliminar todo el suero que pudiera estar presente. Cuando se trabaja con eritrocitos en los que la absorción ha ocurrido "in vivo", es conveniente utilizar de 0.5 a 1.0 ml, cuando menos de eritrocitos, para tener una cantidad suficiente de anticuerpos en el eluido.
3. Después del último lavado con solución salina, eliminar tanta solución salina como sea posible del paquete de eritrocitos.

4. Añadir un volumen igual al que ocupan los eritrocitos, de solución salina.
5. Mezclar perfectamente y colocar el tubo en un baño de agua a 56°C durante 10 minutos, agitando con frecuencia la mezcla.
6. Transladar inmediatamente el tubo a una camisa que con tenga agua previamente calentada a 56°C, para que el tubo no se enfríe durante la centrifugación.
7. Centrifugar inmediatamente a alta velocidad para agru par a los eritrocitos en el menor tiempo posible, es decir, centrifugar a la mayor velocidad posible durante 5 minutos.
8. Retirar inmediatamente el sobrenadante, en donde se en encuentran los anticuerpos eluidos.
9. Marcar dos tubos de ensaye de 12 x 75 mm, uno como "A" y otro como "B" y colocar en cada uno de ellos, una gota del eluido. Añadir una gota de la correspondiente suspen-- sión de eritrocitos lavados, ajustada a una concentración del 2% y mezclar perfectamente. Dejar reposar las mezclas durante 15 minutos a temperatura ambiente y centrifugar ambos tubos durante un minuto a 1000 rpm, o bien a 3400 rpm por medio minuto. Remover suavemente los eritrocitos sedi- mentados y observar las reacciones que se han producido.

ELUCION POR PRECIPITACION CON ALCOHOL
(Método de Weiner)

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

- 5.0 ml de suero procedente de sangre del grupo O.
- 1.0 ml de eritrocitos del grupo A, lavados y centri- fugados.

0.5 ml de una suspensión al 2% de eritrocitos del grupo A, previamente lavados.

0.5 ml de una suspensión al 2% de eritrocitos del grupo B, previamente lavados.

50 ml de solución salina isotónica.

20 ml de etanol al 50%.

Material:

2 tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

1 tubo de centrifuga de 10 ml de capacidad, graduado y con tapón de hule.

4 pipetas capilares.

1 varilla de vidrio delgada, de 20 cm. de largo.

Equipo:

Estufa con temperatura de 37°C.

Congelador.

Centrífuga.

METODOLOGIA

1. Lavar 3 veces con solución salina isotónica, la suspensión de eritrocitos del grupo A, para eliminar el exceso de suero. Después del último lavado con solución salina, eliminar tanta solución salina como sea posible, del paquete de eritrocitos.
2. Colocar el tapón al tubo que contiene el paquete de eritrocitos y someterlos a congelación hasta que estén laqueados, aproximadamente de 30 a 60 minutos. Sacar el tubo del congelador y dejar descongelar los eritrocitos a temperatura ambiente.
3. Añadir 10 volúmenes de etanol al 50% previamente enfriado, por cada volumen de eritrocitos laqueados, mezclan-

do rápidamente. Para mayor comodidad puede conservarse el etanol en el congelador, para emplearlo a medida que se va ya necesitando.

4. Volver a tapar inmediatamente el tubo y colocarlo de nuevo en el congelador, dejarlo ahí durante unos 30 a 60 minutos para que se precipiten completamente los anticuerpos presentes.

5. Sacar el tubo del congelador y centrifugarlo a 3000 rpm durante un mínimo de 5 minutos; el precipitado que se forma es denso y muchas veces queda firmemente adherido a las paredes del tubo. Desechar completamente el sobrenadante y llenar el tubo con agua destilada. Separar el precipitado de las paredes del tubo mediante una varilla de vidrio terminada en punta, tapar el tubo y mezclar vigorosamente su contenido.

6. Volver a centrifugar a 3000 rpm durante 5 minutos y desechar el sobrenadante. Agregar un volumen igual al que ocupa el sedimento de solución salina isotónica y dispersar el sedimento con la varilla de vidrio y mezclar perfectamente.

7. Colocar el tubo en estufa a 37°C durante 30 a 60 minutos.

8. Centrifugar a alta velocidad, 3000 rpm durante 10 minutos y recuperar el sobrenadante con una pipeta capilar. Con este sobrenadante se llevarán a cabo las pruebas de identificación como se describen en los pasos número 7 y 8 de la técnica de elución por calor. Estos eluidos pueden conservarse, si se desea, en congelación para pruebas posteriores.

Resultados:

Al reaccionar los eluidos aglutinando eritrocitos del grupo "A", queda demostrada la existencia de las aglutini-

nas anti-A en los eluidos, y al no producirse reacción positiva en los tubos que contienen a los eritrocitos del grupo B, se prueba que efectivamente se llevó a cabo la separación de los anticuerpos anti-A que existían en el suero procedente de una sangre del grupo O.

ELUCION POR CALOR:

AGLUTINACION

Reacción del eluido con eritrocitos del grupo A

Reacción del eluido con eritrocitos del grupo B

ELUCION POR PRECIPITACION CON ALCOHOL:

Reacción del eluido con eritrocitos del grupo A

Reacción del eluido con eritrocitos del grupo B

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se utiliza suero de una sangre del grupo O en esta técnica?
2. ¿Qué función tiene la solución salina en la prueba?
3. ¿Para qué se utiliza etanol en la elución?
4. ¿Por qué es conveniente añadir proteína a la solución salina en el proceso de elución?
5. ¿Cuál método se aplica más convenientemente en la separación de aglutininas calientes y cuál para aglutininas - frías?
6. ¿Qué prueba sería recomendable realizar antes de practicar la elución?
7. ¿Cuál es el objeto de congelar los eritrocitos en la técnica de elución por precipitación con alcohol?

8. ¿Con qué finalidad se realiza la aglutinación entre el eluído y los eritrocitos del grupo A y B?
9. Mencione otro método que permita determinar la reactividad del eluído.
10. Señale dos aplicaciones de la técnica de elución.

DISCUSION

La elución es una técnica fácil de elaborar, pero requiere mucho tiempo en su ejecución.

Es una técnica muy útil desde el punto de vista qualitativo, por sus múltiples aplicaciones previamente descritas. No proporciona datos cuantitativos, porque no es posible extraer el anticuerpo total absorbido a los eritrocitos, ha--biéndose obtenido varios eluidos activos con los mismos eritrocitos sensibilizados, y porque una determinada proporción del anticuerpo se desnaturaliza.

El método de Weiner, de elución por precipitación con -alcohol, es particularmente útil para estudiar anticuerpos de tipo caliente, mientras que el método de Landsteiner y Miller de elución por calor, es muy útil para el estudio de anticuerpos de tipo fríos, pero sirve también para algunos anticuerpos de tipo caliente.

BIBLIOGRAFIA

1. Dood E. B. y Lincoln J. P. Inmunología de los Grupos - Sanguíneos. 1a. edición. México. Ed. El Manual Moderno, S.A. 1976.
2. Landsteiner K. y Miller C. P. Serological studies on the blood of primates. II.- The blood groups in anthropoid apes. J. Exp. Med., 42:853, 1925.
3. Lynch J. M. y col. Métodos de Laboratorio. 2a. edición. México. Ed. Interamericana. 1972

4. Hughes-Jones N. C., Gardner B y Telford R. Comparison of various methods of dissociation of anti D using ¹³¹I labeled antibody. Vox. Sang., 8:531, 1963.
5. Petz L. D. y Garratty G. Acquired immune hemolytic anemias. 1a. edición. U.S.A. Ed. Churchill Livingstone. 1980.
6. Race R. R. y Sanger R. Blood Groups in Man. 6a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
7. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980
8. Rubin H. Antibody elution from red blood cells. J. Clin. Pathol., 15:70, 1963.
9. Weiner W. Eluting red cell antibodies. A method and its application. Brit. J. Haemat., 3:276, 1957.

PRUEBAS CRUZADAS. DETERMINACION DE LA
COMPATIBILIDAD SANGUINEA

Objetivo: Establecer la importancia de la tipificación de los grupos sanguíneos en los Bancos de sangre.

Analizar el fundamento de las pruebas cruzadas mayor y menor en solución salina y en un medio con alto contenido proteico, y realizar las respectivas técnicas, evaluando la utilidad, ventajas y limitaciones de las mismas.

Generalidades: El término grupo sanguíneo o tipo de sangre, se puede aplicar a todos los marcadores genéticos en la sangre, incluyendo a las proteínas séricas y a las enzimas eritrocíticas (7). Excluyendo a los antígenos privados raros (comunmente restringidos a una o dos familias), existen cerca de 200 antígenos eritrocíticos detectables en forma directa o indirecta, mediante pruebas de aglutinación (4).

La mayoría de estos antígenos pertenecen a uno de los quince sistemas que aparecen en el siguiente cuadro (8).

Año de descubrimiento	Sistema	Ag de los Eritrocitos	Aparición Natural
1901	ABO	A, B, H.	Común
1926	MNSs	M, N, S, s.	
1926	P	P ¹ , P	Regular
1940	Rhesus (Rh)	Rho, D, C, E, c, e.	
1945	Lutheran (Lu)	Lu ^a , Lu ^b	
1946	Kell	K, k, Kp ^a , Kp ^b , Kp ^c , Js ^a , Js ^b .	
1946	Lewis (Le)	Le ^a , Le ^b	Regular
1950	Duffy (Fy)	Fy ^a , Fy ^b	
1951	Kidd (JK)	Jk ^a , Jk ^b	
1955	Diego (Di)	Di ^a , Di ^b	

1956	Cartwright (Yt)	Yt ^a , Yt ^b .
1962	Xg	Xg ^a .
1965	Dombrock (Do)	Do ^a , Do ^b .
1967	Colton (Co)	Co ^a , Co ^b .
1974	Scianna (Sc)	Sc1, Sc2.

La notación de los grupos sanguíneos no sigue un determinado orden. En la mayoría de los casos, el nombre del sistema se deriva del nombre del paciente en el cual se detectó por primera vez el anticuerpo. El principal objetivo del análisis de grupos sanguíneos en un banco de sangre, está dirigido a obtener sangres compatibles para pacientes que requieren una transfusión (9).

Los donadores que van a proporcionar la sangre, deben tener más de dieciocho y menos de sesenta y cinco años, y gozar de buena salud; los posibles donadores tienen que llenar y firmar una autorización escrita, donde describen las enfermedades que han padecido, incluyendo ictericia, paludismo, sífilis, tuberculosis, etc.; también deben mencionar si han recibido sangre en alguna ocasión (1). Cualquier posible donador que ha recibido una vacuna con virus vivo los tres últimos meses, así como los candidatos con fiebre, erupciones no diagnosticadas o linfadenopatías, deben ser rechazados (1). Sólo se aceptan donadores que tienen más de 12.5 g de hemoglobina/dl. Cuando se ordena una transfusión, se envían al laboratorio de 10 a 20 ml de la sangre del paciente con la información adecuada (nombre completo del paciente, número de historia, sexo, edad, diagnóstico, medicamentos, partos, transfusiones previas, reacciones adversas a la transfusión, y anticuerpos identificados previamente) (8).

Antes de efectuar las pruebas cruzadas, se realizan cuatro pruebas en la sangre del paciente y del donador, que incluyen (5): a) la tipificación ABO; b) la tipificación Rho (D); c) la prueba directa de antiglobulina y d) la identificación

de anticuerpos que pueden presentarse en el suero.

Existen dos tipos de pruebas cruzadas, que han sido de signadas como mayor y menor, de acuerdo a su importancia - (3). En la prueba mayor se hace reaccionar el suero del receptor con los eritrocitos del donador, o donadores. En la prueba menor se hace reaccionar el suero del donador con eritrocitos del receptor. Cuando las sangres del donador y del receptor son compatibles, ambas pruebas dan un resultado negativo, observándose que ambos individuos tienen el mismo grupo sanguíneo. En caso de que el donador y el receptor sean de diferentes grupos sanguíneos, pero compatibles, la prueba cruzada mayor será negativa y la menor positiva. (9).

La prueba mayor nunca debe omitirse, porque es decisiva para la seguridad del receptor (5).

Es recomendable utilizar varios métodos de pruebas cruzadas, para reducir los posibles peligros y facilitar la interpretación. Una prueba cruzada completa debe incluir las siguientes pruebas, para descubrir tanto los anticuerpos completos, como los incompletos y los atípicos (1):

1. La prueba en tubo con solución salina a temperatura ambiente, para detectar aglutininas incompletas o bivalentes, como son las anti-A, anti-B y las aglutininas frías.
2. La prueba anterior, pero incubando a 37°C, diseñada para localizar aglutininas calientes, como son las del sistema Rh.
3. La prueba en un medio con elevado contenido proteico - (usando albúmina), para detectar anticuerpos incompletos del sistema Rh. En esta técnica se puede producir el fenómeno de prozona, que se evita empleando una centrifugación inmediata. La actividad de algunas aglutininas (por ejemplo anti-A y anti-B), puede ser suprimida en un medio con albúmina.

4. La prueba de la antiglobulina de Coombs indirecta, en solución salina para detectar la mezcla de anticuerpos salinos e incompletos presentes en el suero y la directa para demostrar anticuerpos fijados a los eritrocitos "in vivo", como ocurre en niños con eritroblastosis fetal, o en pacientes con anemia hemolítica adquirida.

5. Las técnicas de tratamiento de eritrocitos con enzimas tales como papaína, ficina y bromelina, que son extremadamente sensibles para la localización de varios anticuerpos, como son los anti-Rh, anti-Kell, anti-Kidd y otros.

Los pacientes que reciben grandes cantidades de sangre, tienen una mayor probabilidad de producir anticuerpos y - además, existe la posibilidad de que ocurran reacciones entre el plasma y los eritrocitos de los donadores, por lo cual en caso de requerirse, se sugiere buscar cuidadosamente anticuerpos en la sangre donadora, que no pueden ser reconocidos con las técnicas de las pruebas cruzadas (4).

El laboratorista debe recordar que la vida del paciente o la futura familia de una mujer, puede depender del cuidado con que se lleva a cabo una prueba cruzada, por lo cual debe brindar toda su atención a la técnica, teniendo también mucho cuidado en la identificación de las muestras, para evitar errores con las sangres del paciente y de los donadores (2).

Finalmente, una unidad de sangre sólo se puede utilizar sí (6):

1. La prueba cruzada es compatible.
2. La fecha de caducidad no ha pasado.
3. Las pruebas serológicas para sífilis son negativas.
4. El plasma sobrenadante no muestra datos de hemólisis ni de contaminación.

Fundamento: El suero del paciente que requiere una trans fusión se prueba contra eritrocitos provenientes del donador en la prueba mayor, mientras que en la prueba menor, los eritrocitos del paciente se prueban con suero del donador; ambas pruebas se realizan en medio salino y en un medio con elevado contenido protéico, con objeto de detectar tanto anticuerpos completos como anticuerpos incompletos. La presencia de aglutinación o hemólisis en la reacción, indica que existe incom patibilidad de grupos sanguíneos entre el paciente y el donador estudiados.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Anticoagulante EDTA al 10%, 2 gotas.

Sangre venosa del receptor, 5 ml.

Sangre venosa del donador, 5 ml.

Solución salina isotónica, 30 ml.

Albúmina bovina al 30%, 2 gotas.

Material:

2 jeringas hipodérmicas de 10 ml, estériles.

2 agujas hipodérmicas número 20 de dos pulgadas, estériles.

6 pipetas capilares.

6 tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

2 tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

Etiquetas.

Equipo:

Centrífuga.

PRUEBAS CRUZADAS EN MEDIO SALINO.

METODOLOGIA

1. Tomar aproximadamente unos 5 ml de sangre venosa por medio de una jeringa de 10 ml con aguja hipodérmica número 20

de dos pulgadas, y colocarla en un tubo de 13 x 100 mm. que deberá contener una gota de anticoagulante (EDTA); agitar suavemente para evitar la coagulación.

2. Tomar en la misma forma la muestra del donante.

3. Centrifugar las muestras, separar el plasma y colocarlo en tubos de 12 x 75 mm, debidamente etiquetados para su identificación.

4. Lavar los eritrocitos con solución salina isotónica. Preparar con ellos suspensiones al 4-5% en solución salina. Para simplificar la preparación de estas suspensiones, utilizar sangre total: adicionar dos gotas de sangre total a 1.0 ml de solución salina isotónica, así se obtiene una suspensión de aproximadamente el 4%.

5. Marcar un tubo de 12 x 75 mm, "SR/ED"; depositar en él una gota de suero del receptor y añadir una gota de la suspensión de eritrocitos del donador. Esta será la prueba mayor.

6. Marcar otro tubo de 12 x 75 mm como "SD/ED"; depositar una gota del suero del donador y añadir una gota de la suspensión de eritrocitos del receptor. Esta es la prueba menor. En caso de estudiarse más de un donador para el mismo receptor, se debe anotar también un número para la identificación de cada donador.

7. Mezclar el contenido de cada tubo y centrifugar inmediatamente a 1000 rpm durante un minuto, o a 3400 rpm durante 30 segundos.

8. Remover suavemente los eritrocitos del sedimento, y observar si se ha producido la aglutinación macroscópica.

9. Si la prueba mayor muestra aglutinación, las sangres son incompatibles; en caso de obtener resultados negativos o dudosos, incubar de 50 a 60 minutos a 37°C y realizar la prueba de Coombs con los eritrocitos.

PRUEBAS CRUZADAS EN MEDIO CON ELEVADO CONTENIDO PROTEICO.

METODOLOGIA

1. Marcar dos tubos de ensaye de 12 x 75 mm con "albúmina" y "sin albúmina", y depositar en cada uno de ellos dos gotas del suero receptor.
2. Añadir a cada tubo, mediante un palillo de madera o una pipeta pequeña, una pequeña cantidad de sangre total del donador, suficiente para dar una concentración final en la mezcla, de aproximadamente 2-4% de eritrocitos.
3. Agregar al tubo marcado con albúmina, dos gotas de la albúmina bovina al 30%.
4. Mezclar perfectamente el contenido de los tubos, e inmediatamente centrifugar a 1000 rpm durante un minuto, o a 3400 rpm por 30 segundos.
5. Remover suavemente el sedimento de eritrocitos y observar si ha ocurrido la aglutinación macroscópica. Si la reacción es positiva, las sangres son incompatibles; en caso de obtener una aglutinación dudosa o negativa, resuspender los eritrocitos e incubar los tubos durante 10 minutos a 37°C. Cuando se utiliza sangre total en estas pruebas, no se debe incubar por más de 15 minutos, pues puede producirse una aglutinación inespecífica.

Resultados:

La presencia de aglutinación o hemólisis, en cualquiera de ambas pruebas, indica que hay incompatibilidad entre donador y receptor; y por lo tanto debe buscarse otro donador para poder realizar la transfusión.

Nombre del receptor:

Nombre del donador:

Prueba cruzada en medio salino:

Prueba Mayor _____ Prueba Menor _____

· Prueba cruzada en medio con alto contenido protéico:
Albúmina: _____ Sin Albúmina _____

CUESTIONARO

1. ¿Desde el punto de vista médico, cuál es el sistema sanguíneo más importante?
2. ¿Por qué las aglutininas IgM tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos en suspensión salina?
3. ¿Cuál es la importancia de la prueba mayor?
4. ¿Qué carga eléctrica tienen sobre su superficie, los eritrocitos?
5. ¿A qué sustancia se debe la carga eléctrica sobre la superficie de los eritrocitos?
6. ¿Cuál es la función de la albúmina bovina en la reacción de aglutinación?
7. ¿Qué otras moléculas pueden emplearse en lugar de la albúmina, para aumentar la actividad antígeno-anticuerpo?
8. ¿A qué temperaturas reaccionan mejor los anticuerpos completos e incompletos, respectivamente?
9. ¿Qué efecto tiene la administración de sangre incompatible en un paciente?
10. Mencione tres indicaciones para realizar una transfusión.

DUSCUSION

Las pruebas cruzadas son sumamente importantes, y deben ser realizadas antes de administrar una transfusión, pues nunca deben mezclarse sangres "in vivo", sin tener la seguridad de que existe compatibilidad.

Por meticulouso que haya sido efectuada la titpificación del donador y del paciente, y por escrupulosa que haya sido la búsqueda de anticuerpos atípicos en el suero del paciente, no debe omitirse numa la prueba mayor, que permite excluir la presencia de anticuerpos potencialmente peligrosos con un título significativo.

La prueba menor no se realiza tan frecuentemente por considerarse que el plasma del donador con los anticuerpos que pueda contener, se diluye considerablemente cuando se transfunde al paciente, aunque es recomendable hacer esta prueba. Las pruebas cruzadas requieren de aproximadamente 2 a 3 horas para ser ejecutadas, y en una urgencia este tiempo no puede ser desperdiciado. (LAS PRUEBAS TARDAN DE 45-60 MIN.)

BIBLIOGRAFIA

1. Dood E. B. y Lincloln J. P. Immunología de los Grupos Sanguíneos. 1a. edición. México. Ed. El Manual Moderno, S.A. 1976.
2. Farr A.D. Selection of procedures for compability testing of blood. Med. Lab. Scie., 37(2):105, 1980.
3. Garvey J. S., Cremer N. y Sussdorf D. H. Methods in Immunology. 3a. edición. U.S.A. Ed. W. A. Benjamin Inc. 1977.
4. Gell P. G. H., Coombs R. R. A. y Lachmann P. J. Clinical Aspects of Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
5. Miller W. B. y col. Technical Manual of the American Association of Blood Banks. 7a. edición. U.S.A. Ed. J. B. Lippincott Co. 1977.
6. Moore B. P. L. Serological and Immunological Methods of the Canadian Red Cross Blood Transfusion Service. 8a. edición. Canada. Ed. The Canadian Red Cross Society. 1980.
7. Race R. R. y Sanger R. Blood Groups in Man. 6a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
8. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.

9. Wintrobe M. M. Clinical Hematology. 7a edición. - U.S.A. Ed. International Copyright Union. 1974.
10. World Health Organization. Twenty-eight Report of WHO Expert Committee on Biological Standardization. W.H.O. Tech. Rep. Ser.,610,1977.
11. Zmijewski C. M. Immunohematology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Prentice Hall Inc. 1978.

PRUEBAS DE LA ANTIGLOBULINA DE COOMBS. DETECCIÓN
DE ANTICUERPOS FRENTE AL FACTOR Rh(D)

Objetivo: Analizar el fundamento de las pruebas directa e indirecta de la antiglobulina de Coombs, utilizando ambas técnicas, en la detección de anticuerpos incompletos frente al factor Rh(D). Evaluar la utilidad, ventajas y limitaciones de la técnica, señalando otras aplicaciones de la misma.

Generalidades: El principio de la reacción de la antiglobulina, fue descrito por primera vez en 1908 por Moreschi, pero fue redescubierto y desarrollado independientemente como un método para demostrar anticuerpos incompletos de los antígenos de eritrocitos, por Coombs, Mourant y Race en 1945 (2).

En los estados de isoinmunización, con frecuencia se forman anticuerpos que no son capaces de aglutinar a su antígeno específico, solo se fijan a él; a este tipo de anticuerpos se les denomina incompletos o univalentes (5). Los anticuerpos incompletos son inmunoglobulinas, del tipo IgG generalmente, aunque también se han encontrado del tipo -- IgA o IgM (8).

Los anticuerpos incompletos fallan en la producción de aglutinación con eritrocitos homólogos en suspensión salina, aunque se combinan firmemente con los antígenos de los eritrocitos; permanecen firmemente unidos a la membrana celular, si las células se lavan con solución salina para remover las proteínas séricas no adsorbidas (3). Para poner de manifiesto la existencia de estos anticuerpos cuando están recubriendo a su antígeno, se utiliza la prueba de la antiglobulina, que es un procedimiento serológico simple para demostrar las globulinas firmemente unidas a las células, y que se basa en el empleo de otro sistema antígeno-anticuer-

po (6). Como el anticuerpo incompleto está constituido por gamma-globulina humana, al añadir un suero anti-gamma-globulina humana a los eritrocitos recubiertos por él, se llevará a cabo la aglutinación, al efectuarse la reacción entre la gamma-globulina y el suero anti-gamma-globulina humana, actuando el eritrocito únicamente como soporte mecánico (8).

El suero antiglobulina humana se prepara inyectando animales, generalmente conejos o cabras, con plasma o globulina humana, y recibe el nombre de antiglobulina de - - Coombs (3).

Con la reciente caracterización de la especificidad antigénica de las diferentes inmunoglobulinas, puede prepararse un suero antiglobulina específico y selectivo para las diferentes clases de inmunoglobulinas (5). No obstante, como en ciertos procedimientos de inmunización se forman anticuerpos que no residen precisamente en la fracción gamma-globulina, sino en otras fracciones globulínicas, es necesario realizar la prueba con el suero anti-gamma-globulina, y con el suero anti-no gamma-globulina, para lograr así la detección de ciertos anticuerpos no constituidos por gamma-globulina y que pueden dar lugar a una reacción post-transfusional (8).

La prueba de la antiglobulina puede efectuarse en dos formas (3):

1. La prueba directa que se utiliza para detectar a los anticuerpos que se han fijado a los eritrocitos "in vivo"; es un procedimiento corto que se emplea en el diagnóstico de la enfermedad hemolítica del recién nacido, o en la anemia hemolítica adquirida, donde se prueban células tomadas del paciente, con suero antiglobulina. En la eritroblastosis fetal, al nacer el niño, sus eritrocitos pueden estar recubier

tos por anticuerpos incompletos elaborados por la madre. En la anemia hemolítica adquirida, por un fenómeno de autoinmunización, los eritrocitos del paciente pueden estar recubiertos por anticuerpos incompletos formados por el propio organismo del paciente. En los pacientes que han recibido múltiples transfusiones, también puede presentarse este fenómeno.

2. La prueba indirecta es un procedimiento empleado para examinar un anticuerpo incompleto del suero y consta de tres etapas: 1) sensibilización de los eritrocitos; 2) lavado de los eritrocitos libres de suero, y 3) mezcla de los eritrocitos lavados con antiglobulina humana. Este tipo de reacción se lleva a cabo en las mujeres Rh negativas embarazadas, cuando el padre es Rh positivo y existe la posibilidad de que ocurra la sensibilización de la madre; también se realiza como prueba de rutina en las transfusiones y para detectar las variantes débiles del factor Rh y del sistema ABO, así como para la identificación de los grupos raros.

Las pruebas de Coombs pueden realizarse en placa o en tubo (8). Es muy importante recordar que cualquier huella de suero, por las globulinas que contiene, neutralizará el suero de Coombs y la prueba resultará negativa (3).

Fundamento: En la prueba directa, los eritrocitos del paciente que van a ser examinados frente al factor Rh, se lavan en solución salina, se mezclan con la aglutinina de Coombs, y se produce la aglutinación, que indica la presencia de anticuerpos incompletos. En la prueba indirecta, los eritrocitos del posible donador, son mezclados con el suero del receptor (que contiene anticuerpos de los antígenos eritrocíticos del donador) con objeto de sensibilizarlos, se lavan con solución salina para eliminar las globulinas que no se unieron a los eritrocitos, y finalmente se mezclan

con la antiglobulina de Coombs que debe producir aglutinación, demostrándose así la reacción de los anticuerpos incompletos con sus antígenos eritrocíticos "in vitro".

TECNICA

PRUEBA DIRECTA EN TUBO.

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

3 gotas de suero antiglobulina de Coombs.

1 gota de una suspensión al 2% de eritrocitos del paciente (lavados).

1 gota de una suspensión al 2% de eritrocitos de una persona normal (lavados).

1 gota de una suspensión al 2% de eritrocitos Rh positivos, sensibilizados con suero anti-Rh (lavados).

50 ml de solución salina isotónica.

Material:

8 tubos para centrífuga de 20 ml de capacidad, graduados.

6 pipetas capilares.

4 tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

Equipo:

Centrífuga.

Estufa a temperatura de 37°C

METODOLOGIA

1. Lavar los eritrocitos en estudio, por lo menos 4 veces con solución salina isotónica, para eliminar cualquier traza de proteínas séricas no absorbidas a los eritrocitos; preparar con los eritrocitos lavados, una suspensión al 2%.

2. Depositar en el tubo que contiene una gota de eritrocitos, una gota de suero de Coombs (antiglobulina humana).

3. Mezclar perfectamente el contenido del tubo y centrifugar a 1000 rpm durante un minuto, o bien a 3400 rpm durante 30 segundos. Remover suavemente el sedimento, y observar si ha ocurrido aglutinación macroscópica.

4. Es muy conveniente hacer la reacción al mismo tiempo con testigos constituidos por:

a) Una gota de eritrocitos del paciente, lavados y ajustados al 2%, que se mezclará con una gota de suero de Coombs; servirá para detectar una aglutinación inespecífica.

b) Una gota de eritrocitos normales, lavados y ajustados al 2%, que se mezclará con una gota de suero de Coombs; servirá como testigo negativo.

c) Una gota de eritrocitos sensibilizados que servirá como testigo positivo. Este testigo puede prepararse añadiendo a una gota de una suspensión de eritrocitos Rh positivos, lavados y ajustados al 2%, una gota de suero anti-Rh, diluido 1:16 e incubado a 37°C durante 15 minutos; centrifugar y lavar cuatro veces con solución salina isotónica y preparar una suspensión al 2%. Una gota de esta suspensión, se mezcla con una gota de suero de Coombs.

PRUEBA DIRECTA EN PLACA

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Los mismos que se utilizan en la prueba anterior, pero las suspensiones se preparan al 50%, en lugar de al 2%.

Material:

El mismo que el anterior.

4 portaobjetos excavados.

Aplicadores de madera.

Equipo:

Centrífuga.

Lámpara.

METODOLOGIA

1. Centrifugar los eritrocitos, por lo menos seis veces con solución salina isotónica, ya que se requieren concentraciones mayores de eritrocitos, y por lo tanto hay que tener la completa seguridad de haber eliminado cualquier traza de proteína plasmática no absorbida. Con estos eritrocitos lavados, preparar suspensiones en solución salina isotónica al 50%.
2. Colocar una gota de esta suspensión, en un portaobjetos excavado perfectamente limpio.
3. Depositar junto a la gota de eritrocitos, una gota de suero de antiglobulina de Coombs.
4. Mezclar ambas gotas con un aplicador de madera; colocar la placa encima de una fuente luminosa, inclinándola suavemente de lado a lado.
5. Preparar los testigos en la misma forma que se describió para la técnica en tubo, sólo que ajustados al 50%. No debe omitirse este paso, si se quiere tener seguridad en los resultados.

PRUEBA INDIRECTA EN TUBO
TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

2 gotas de suero problema.

2 gotas de una suspensión al 4-5% de eritrocitos Rh positivos (lavados).

1 gota de suero antiglobulina de Coombs.

30 ml de solución salina isotónica.

Material:

2 tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

2 tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

4 pipetas capilares.

Equipo:

Centrífuga.

Estufa a temperatura de 37°C.

METODOLOGIA

1. Depositar 2 gotas de la suspensión de eritrocitos al 4-5%, en un tubo de ensaye de 12 x 75 mm.
2. Añadir 2 gotas del suero en estudio.
3. Mezclar perfectamente y centrífugar a 1000 rpm durante un minuto, o bien a 3400 rpm durante 30 segundos; la centrifugación inmediata puede poner de manifiesto a los anticuerpos que de otra manera, producirían el fenómeno de prozona.
4. Agitar suavemente los eritrocitos sedimentados y observar si existe aglutinación, lo que indicaría la presencia de anticuerpos incompletos. Si la reacción es negativa, débilmente positiva o dudosa, colocar el tubo a 37°C durante 30

a 60 minutos. Cuando se está determinando la presencia de un anticuerpo cuya potencia se desconoce, se recomienda que el periodo de incubación no sea mayor de 60 minutos.

5. Volver a centrifugar a 1000 rpm durante un minuto, o bien a 3400 rpm durante 30 segundos.

6. Agitar suavemente los eritrocitos sedimentados, y observar si ha ocurrido aglutinación macroscópica. Si la reacción continúa siendo negativa o dudosa, se debe proceder de la siguiente manera:

7. Lavar los eritrocitos por lo menos cuatro veces con solución salina isotónica, después del último lavado, decantar la mayor cantidad posible de solución salina, y resuspender los eritrocitos en la gota que queda después de decantar.

8. Añadir una gota de suero antiglobulina de Coombs al tubo que contiene los eritrocitos.

9. Mezclar perfectamente y centrifugar a 1000 rpm durante un minuto, o bien a 3400 rpm durante 30 segundos.

10. Agitar los eritrocitos sedimentados suavemente, y observar si ha ocurrido aglutinación macroscópica.

PRUEBA INDIRECTA EN PLACA TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Los mismos que en la técnica anterior, pero la suspensión de eritrocitos se prepara al 50%.

Material:

El mismo que en la técnica anterior.

1 portaobjetos.

Aplicador de madera.

Equipo:

Centrífuga.

Estufa a temperatura de 37°C.

Lámpara.

METODOLOGIA

1. Preparar una suspensión de eritrocitos que contengan el aglutinógeno, cuyos anticuerpos correspondientes se investiguen en el suero problema.
2. Depositar dos gotas de la suspensión de eritrocitos en un tubo de ensaye de 12 x 75 mm.
3. Añadir cinco gotas del suero en estudio.
4. Mezclar perfectamente e incubar a 37°C durante 30 a 60 minutos.
5. Lavar los eritrocitos por lo menos cuatro veces con solución salina isotónica; después del último lavado, decantar perfectamente el sobrenadante y añadir al paquete celular un volumen igual de solución salina isotónica, para tener una suspensión de eritrocitos al 50%.
6. Depositar una gota de la suspensión de eritrocitos en un portaobjetos perfectamente limpio.
7. Depositar junto a la gota de eritrocitos, una gota de suero de Coombs, mezclar con un aplicador de madera. Sostener el portaobjetos sobre una fuente luminosa inclinándolo suavemente de un lado a otro.
8. Los eritrocitos completamente recubiertos de anticuerpos, dan una aglutinación macroscópica en unos cuantos segundos. - Las reacciones más débiles, pueden requerir de 1 a 2 minutos, pero la lectura deberá hacerse antes de que la gota comience a secarse.

Resultados:

AGLUTINACION

PRUEBA DIRECTA EN TUBO:

Problema	_____
Testigo positivo	_____
Testigo negativo	_____
Testigo de aglutinación inespecífica	_____

PRUEBA DIRECTA EN PLACA:

Problema	_____
Testigo positivo	_____
Testigo negativo	_____
Testigo de aglutinación inespecífica	_____

PRUEBA INDIRECTA EN TUBO:

Problema	_____
----------	-------

PRUEBA INDIRECTA EN PLACA:

Problema	_____
----------	-------

CUESTIONARIO

1. ¿Cómo se prepara el suero con antiglobulina de Coombs?
2. ¿En que caso se requiere utilizar complemento en la prueba de Coombs?
3. ¿Cómo se preparan las suspensiones de eritrocitos al 2 y al 5%?
4. ¿En qué forma puede evitarse la aglutinación inespecífica, en caso de presentarse en la prueba?
5. ¿Qué características tienen los anticuerpos incompletos?

6. ¿Cuál es la diferencia entre las pruebas directa e in directa de Coombs?
7. ¿Qué ventaja tiene la prueba en tubo, sobre la prueba en placa?
8. Mencione otra técnica útil para identificar anticuerpos incompletos.
9. ¿Cuál es la técnica de Rose-Waaler?
10. Señale otras dos aplicaciones de la prueba de la inmunoglobulina de Coombs.

DISCUSION

La prueba de la antiglobulina de Coombs, es muy útil para detectar anticuerpos incompletos que son incapaces de producir aglutinación con una suspensión salina de eritrocitos homólogos; aprovecha la firme unión de los anticuerpos a la membrana celular, que permite lavar los eritrocitos en solución salina para eliminar las proteínas no adsorbidas y tener especificidad.

Es un método serológico sencillo que tiene su mayor aplicación en el diagnóstico de la anemia hemolítica del recién nacido, detectando anticuerpos incompletos del factor Rh, en la tipificación de grupos sanguíneos, y en la investigación de anemia hemolítica adquirida.

El suero antiglobulina puede prepararse específica y selectivamente para las diferentes clases de inmunoglobulinas.

Es habitual referirse a la prueba en la cual los eritrocitos son sensibilizados con anticuerpos "in vitro", como la prueba de la antiglobulina indirecta, mientras que la etapa de sensibilización que se ha efectuado "in vivo", constituye la prueba directa.

En la prueba indirecta, es muy importante tener la porción óptima de suero/eritrocitos. A veces es benéfico - añadir albúmina en la etapa de sensibilización, ya que esta produce un aumento en la aglutinación final. Se ha encontrado que algunos anticuerpos trabajan efectivamente, sólo si se usan eritrocitos previamente tratados con una enzima.

Un punto importante que debe apreciarse al añadir antiglobulina a las células sensibilizadas, es que un exceso de anti-IgG, puede inhibir la aglutinación de los eritrocitos sensibilizados con IgG, por efecto del fenómeno de prozona.

En la actualidad, existe equipo automatizado diseñado para realizar la etapa de lavado y de la adición de antiglobulina a la prueba, ambos pasos tediosos, cuando se analizan muchas muestras.

BIBLIOGRAFIA

1. Bellanti J. A. Inmunología II. 1a. edición. México. Ed. Interamericana. 1980.
2. Coombs R. R. A.; Mourant A. E. y Race R. R. A. A new test for the detection of weak and incomplete Rh agglutinins. Br. J. Exp. Pathol., 26:255, 1945.
3. Dodd E. B. y Lincoln J. P. Inmunología de los Grupos Sanguíneos. 1a. edición. México. Ed. El Manual Moderno, S.A. 1976.
4. Fuller T. C., Cozmi A. B. y Russell P. S. Use of an antiglobulin ATG reagent for detection of low levels of alloantibody, improvement of allograft survival in presensitized recipients. Transplant Proc., 10:463, 1978.
5. Gell P. G. H., Coombs R. R. A. y Lachmann P. J. Clinical Aspects of Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.

6. Humphrey H. J. y White R. G. Immunology for Students of Medicine. 1a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1971.
7. A Combined Study from Centers in England and Baltimore. Prevention of Rh-Haemolytic Disease: Results of the Clinical Trial. Brit. Med. J., 2:907, 1966.
8. Rose R. N. y Bigazzi E. P. Methods in Immunodiagnosis. 1a. edición. U.S.A. Ed. John Wiley & Sons. 1973.
9. Wintrobe M. M. Clinical Hematology. 1a. edición. - - U.S.A. Ed. International Copyright Union. 1974.
10. Zmijewski C. M. Immunoematology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Prentice Hall Inc. 1978.

COMPLEMENTO

En la sangre de los vertebrados se han reconocido varios sistemas de activación esenciales en la sobrevivencia del animal. Estos sistemas incluyen a el complemento, dependiente de la activación secuencial de una serie de zimógenos proteolíticos. El complemento es el sistema más complejo, y tiene interés por varias razones:

En primer lugar, como se reconoció hace aproximadamente 80 años, el sistema del complemento es el responsable de la destrucción y eliminación de material externo del cuerpo, especialmente de bacterias y virus. Comúnmente esto sucede después de la interacción de anticuerpos con organismos o sustancias externas, siendo el complemento un mecanismo efector de la defensa inmune contra la infección. El complemento puede actuar también activado por polisacáridos complejos, antes de la reacción con anticuerpos, produciendo una defensa inmediata antes del desarrollo de la inmunidad.

Segundo, los receptores para las proteínas del complemento activado, como es el caso del componente C_3 , están presentes en los linfocitos, macrófagos y algunas otras células, y existen evidencias de que estos receptores en los linfocitos, tienen un papel importante en la interacción entre diferentes clases de ellos o de sus células precursoras.

Tercero, se ha encontrado que varias proteínas del complemento son codificadas por genes estructurales que aparecen en el locus mayor de histocompatibilidad en el hombre y el ratón. El significado biológico de estos hallazgos es aún incierto, pero se ha sugerido que pueden implicar que cierta proteína del complemento tiene un papel como proteína de superficie, al igual que las otras proteínas codificadas por ese gen complejo.

Por todo lo anterior, el interés del sistema del complemento se ha incrementado mucho, y el progreso en el aislamiento y caracterización de varios componentes, ha permitido determinar su estructura y los mecanismos bioquímicos del sistema de activación. Se ha enfatizado la importancia biológica de este sistema, al observar que el mismo se encuentra presente en invertebrados y se ha conservado durante la evolución.

Al reconocerse las múltiples funciones del complemento, se han desarrollado técnicas que miden diversas propiedades del mismo. Existen pruebas que miden la actividad hemolítica del complemento, pruebas que cuantifican las proteínas del complemento y pruebas que miden la capacidad del suero de neutralizar la actividad del componente C_1 , entre otras. También los análisis de inmunocitoadherencia, quimiotaxis y anafilotoxinas, son útiles para evaluar el estado del sistema del complemento. Los depósitos de complemento "in vivo" se reconocen utilizando métodos de inmunofluorescencia en tejidos congelados.

La medición del complemento tiene utilidad diagnóstica, puede establecer la actividad de determinadas enfermedades, y sirve también para evaluar el tratamiento.

Las propiedades del complemento como amplificador inmunológico, se han aprovechado en la evaluación de antígenos y anticuerpos, aplicando la propiedad que tiene de fijarse a complejos antígeno-anticuerpo y producir citolisis.

DETERMINACION CUANTITATIVA DEL COMPLEMENTO TOTAL 50%
HEMOLITICO

Objetivo: Realizar la determinación cuantitativa del complemento 50% hemolítico. Analizar la propiedad del complemento como indicador de la reacción antígeno-anticuerpo, sus mecanismos de acción y la ventaja que representa esta determinación, tanto a nivel experimental, como a nivel clínico. Familiarizarse con los cuidados que se requieren en la elaboración de esta técnica, y las aplicaciones que tiene.

Generalidades: El descubrimiento del complemento surgió de las observaciones de Buchner en 1889, al notar que el suero sanguíneo ejercía una acción destructora sobre las bacterias, y Nuttall encontró que este poder decrecía a medida que el suero envejecía, o se perdía rápidamente por calentamiento a 56°C (11).

Por definición del W.H.O., el término complemento, se aplica a un sistema de factores presente en el suero normal, que se activan por la interacción antígeno-anticuerpo, y actúan en un número significativo de interacciones biológicas (2).

Estos factores del complemento, son globulinas con diversos P.M., movimientos electroforéticos y coeficientes de sedimentación, presentes con ciertas variaciones, en los vertebrados (10).

Los factores del complemento se activan en una sucesión de reacciones enzimáticas, al estar presente una reacción antígeno-anticuerpo (IgM e IgG generalmente), pudiéndose hacer una analogía con los factores de la coagulación, en el sentido de que sus distintos componentes, presentan una sucesión de interacciones para la función global (9).

La activación parcial o completa del complemento, además

de estar causada por una gamma-globulina agregada, puede efectuarse por veneno de cobra, proteasa tisular, ciertas enzimas lisosomales, tripsina, plasmina y endotoxina (2). En el caso de la activación por anticuerpos, la fijación es una función de la región Fc de la molécula del anticuerpo, por medio de activación alostérica (11). La concentración de complemento no aumenta después de una estimulación antígenica (11).

Se han desarrollado numerosos métodos para la titulación de la actividad hemolítica del complemento. La mayoría cuantifican la dilución requerida de suero, para lisis una determinada cantidad de células indicadoras bajo condiciones estandarizadas, utilizando distintos amortiguadores, condiciones de reacción, volúmenes, células indicadoras, puntos finales y formas de cuantificar la hemólisis (2).

Por conveniencia, se ha considerado que una unidad de complemento (C'_{50}), es la cantidad de suero requerida para provocar la lisis del 50% de los eritrocitos, puesto que el 100% de lisis da una curva sigmoideal, requiriéndose incrementos relativamente grandes de complemento, para producir la lisis del último 5-10% de los eritrocitos (12).

Para la descripción matemática de la curva sigmoideal de la reacción hemolítica, se utiliza la ecuación de Von Krogh (5):

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

Donde:

x = cantidad de complemento (expresado en ml de suero diluido de cobayo).

K = constante correspondiente a la unidad del complemento 50% hemolítico.

$\frac{y}{1-y}$ = a la unidad.

1/n = exponente que determina la forma de la curva sigmoidal.

La unidad hemolítica del complemento del 50%, es una unidad arbitraria, ya que su magnitud depende de la concentración de los eritrocitos, de la fragilidad de las células, de la cantidad de anticuerpo usado para la sensibilización, de la naturaleza de este anticuerpo, de la fuerza iónica del sistema de reacción, de la concentración de los iones Ca^{++} y Mg^{++} , del pH, del tiempo de reacción y de la temperatura (5).

La prueba sirve para cuantificar el complemento, en la evaluación de pacientes, para detectar principalmente individuos con niveles deficientes del mismo, para determinar la presencia, ausencia y consecuencias de procesos inmunes, y sirve como indicador de la respuesta terapéutica, así como para detectar individuos con deficiencias innatas de los componentes del complemento, o la presencia de inhibidores del mismo (7).

El complemento se encuentra aumentado en el suero de pacientes con infarto agudo al miocardio, dermatomiositis, periartritis nodosa, fiebre reumática aguda, poliartritis aguda, tiroiditis y otras (2). Se encuentra bajo o ausente, en enfermedades tales como patologías hereditarias, como serfa el caso del edema angioneurótico hereditario y la agammaglobulinemia (2). Existen anomalías también por el aumento de su consumo, como en el caso del lupus eritematoso diseminado, glomerulonefritis, anemia hemolítica autoinmune y - - otras (2).

Fundamento: Al incubar diluciones seriadas del suero de coyabo, cuya concentración de complemento se requiere determinar, con eritrocitos sensibilizados con una cantidad ópti

ma de hemolisinas, se determina la capacidad hemolítica del complemento por la vía clásica, graficando la relación entre los porcentajes de hemólisis obtenidos espectrofotométricamente y la cantidad de suero diluido en cada tubo, para calcular las unidades hemolíticas del suero de cobayo.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

1. Sangre de carnero estéril, conservada en solución de Alsever.
2. Solución de hemolisina con título conocido.
3. Solución amortiguadora de trietanolamina salina (TBS) con pH de 7.3 - 7.4.
4. Suero de cobayo, cuya concentración de complemento se requiere determinar.
5. Agua destilada.

Material:

- 3 pipetas de 10 ml.
- 4 pipetas de 5 ml.
- 10 pipetas de 1 ml.
- 3 pipetas de 0.2 ml.
- 20 tubos de 13 x 100 mm.
- 5 tubos de 16 x 150 mm.
- 1 gradilla.
- 1 matraz Erlenmayer de 50 ml.

Equipo:

- Colorímetro Coleman Jr.
- Estufa a temperatura de 37°C.
- Baño de hielo.

METODOLOGIA

1. Preparar una suspensión al 2% de eritrocitos de carnero (GRC) en TBS. Volumen de 5 ml.
2. Ajustar espectrofotométricamente la suspensión de GRC: En un tubo de ensaye se mezclan 0.3 ml de la suspensión de GRC + 1.7 ml de agua destilada. Leer la D.O. en un Coleman Jr. a 550 nm, utilizando como blanco agua destilada. El 100% de hemólisis debe dar una D.O. = 0.50. Si no se obtiene esta lectura, corregir el volumen aplicando la siguiente ecuación:

$$D.O._1 \times V_1 = D.O._2 \times V_2$$

3. Diluir la hemolisina en TBS 1:2000, para utilizar un volumen de 5 ml.
4. Mezclar volúmenes iguales de hemolisina y GRC; añadir lentamente y agitando el matraz, 5 ml de la solución de hemolisina a 5 ml de la suspensión de GRC.
5. Incubar la mezcla a 37°C durante 30 minutos. Luego colocar el matraz sobre hielo.
6. Preparar 3 diluciones del suero de cobayo (1:200, 1:250 y 1:300) a partir de una dilución inicial 1:50 con 0.03 ml de suero + 1.47 ml de TBS (dilución 1:50).

Suero 1:50	TBS
0.4 ml	1.2 ml (dilución 1:200)
0.3 ml	1.2 ml (dilución 1:250)
0.3 ml	1.5 ml (dilución 1:300)

Mantener los tubos en frío, sobre hielo.

7. En una gradilla sobre hielo, colocar una serie de 4 tubos para cada dilución (12 tubos), más 2 tubos controles - (testigos positivo y negativo).
8. Repartir el volumen de cada dilución en los 4 tubos co

respondientes, pipeteando cantidades diferentes a cada tubo. Luego añadir TBS hasta completar un volumen final de 0.9 ml para cada tubo.

Tubo	1	2	3	4	+T	-T
Suero diluido ml	0.5	0.35	0.25	0.15	-	-
TBS ml	0.4	0.55	0.65	0.75	-	0.9

9. Añadir a cada tubo 0.6 ml de la suspensión de eritrocitos sensibilizados.
10. Agitar fuertemente todos los tubos para mezclar bien.
11. Pasar la gradilla con los tubos a baño de 37°C durante 30 minutos. Agitar los tubos a intervalos de 10 minutos.
12. Al terminar la incubación, añadir 0.5 ml de TBS frío a todos los tubos menos al control positivo, al cual se le añade 1.4 ml de agua destilada. Agitar nuevamente.
13. Centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.
14. Decantar a una cubeta y leer en un Coleman Jr. a 550 nm, la D.O. del contenido de cada tubo. Utilizar como blanco el control negativo.

Resultados:

Tubo	Dilución 1:200		1:250		1:300	
	D.O.	%	D.O.	%	D.O.	%
1						
2						
3						
4						
T+		100%				

Sobre un papel semilogarítmico de probitas, se grafica

la relación entre los porcentajes de hemólisis y la cantidad de suero diluido que se añadió a cada tubo. Se hace esto con las tres diluciones utilizadas. Se unen los puntos con una línea recta y se determina para cada dilución, el volumen de la misma que produce un 50% de hemólisis. La unidad 50% hemolítica es:

_____ ml de suero diluido 1:200.
_____ ml de suero diluido 1:250.
_____ ml de suero diluido 1:300.

Expresar las unidades 50% hemolíticas/ml de suero de cobayo no diluido: calcular por una regla de tres cuantas unidades 50% hemolíticas contiene 1 ml de suero diluido, y luego multiplicar este valor por el denominador de la dilución:

_____ ml de suero diluido _____ 1 Unidad C'H₅₀
1 ml de suero diluido _____ X

X = Unidades de C'H₅₀/ml de suero de cobayo diluido.

X de 1:200 = _____ X de 1:250 = _____ X de 1:300 = _____

Y = Unidades de C'H₅₀/ml de suero de cobayo.

Y de la dilución 1:200 = X de 1:200 x 200 = _____.

Y de la dilución 1:250 = X de 1:250 x 250 = _____.

Y de la dilución 1:300 = X de 1:300 x 300 = _____.

Idealmente, los tres resultados deben ser iguales.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué son las hemolisinas?
2. ¿Para qué se utiliza el suero de cobayo con el complemento titulado?
3. ¿Qué efecto tiene la concentración de hemolisinas en la prueba?

4. ¿Por qué se requiere la presencia de los iones calcio y magnesio para que se efectúe la reacción?
5. ¿Cuál es el objeto de utilizar TBS frío con pH de 7.4?
6. ¿Por qué se realiza una incubación a 37°C por 30 minutos?
7. ¿Qué cuidados y precauciones requiere la determinación?
8. ¿Cuál es la ecuación de Von Krogh, y qué utilidad tiene?
9. Esquematice la fijación de complemento desde la unión antígeno-anticuerpo, hasta la producción de hemólisis.
10. ¿Con qué objeto se realiza esta determinación en suero humano?

DISCUSION

La técnica de la determinación cuantitativa del $C'H_{50}$, tiene como ventaja fundamental su alto grado de sensibilidad. Es útil tanto para la determinación del complemento, como con ciertas modificaciones, para la determinación de antígenos y anticuerpos. Esta técnica no requiere de mucho tiempo para su ejecución, ni de aparatos sofisticados. Es una técnica muy sencilla en su elaboración, y el suero de cobayo ya titulado, sirve como fuente de complemento en múltiples determinaciones.

Entre las desventajas que presenta esta técnica, podríamos mencionar la necesidad de utilizar reactivos frescos, debiéndose prescindir de reactivos almacenados por largo tiempo, como sería el caso de la sangre de carnero y el suero de coyabo: la hemolisina si puede conseguirse liofilizada.

Es muy importante considerar la cantidad de anticuerpo requerida para una sensibilización óptima, y hay que tomar en cuenta que existen hemolisinas naturales en la sangre de

la mayoría de los animales. Otro punto que debe vigilarse es el volumen, puesto que a mayor volumen, el grado de lisis baja.

La actividad hemolítica del complemento, varía inversamente con la fuerza iónica del diluyente, por lo cual es conveniente verificar la concentración del amortiguador.

El calcio y el magnesio son imprescindibles en la reacción, pero una alta concentración de complemento inhibe la fijación de complemento.

La reacción hemolítica da títulos más altos a 30°C, pero requiere por lo menos tres horas para alcanzar el punto final.

En humanos esta determinación es importante desde el punto de vista clínico, porque detecta anomalías relacionadas con el complemento.

BIBLIOGRAFIA

1. Campbell H. D., Gravey S. J., Cremer E. N. y Sussdorf H. D. *Methods in Immunology*. 2a. edición. U.S.A. Ed. W. A. Benjamin Inc. 1974.
2. Gell P. G. H., Coombs R. R. A. y Lachmann P. J. *Clinical Aspects of Immunology*. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
3. Gordon L. B. *Lo esencial de la Inmunología*. 2a. edición. México. Ed. El Manual Moderno. 1980.
4. Humphrey H. J. y White R. G. *Immunology for Students of Medicine*. 1a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1971.
5. Kabat E. E. y Mayer M. M. *Experimental Immunochimistry*. 2a. edición. U.S.A. Ed. Charles C. Thomas Pub. 1971.

6. Kerr A. M. The Complement System. Bioch. Educ., 9:3, 1981.
7. Kwapinsky J. E. Research in Immunochemistry and Immunobiology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Univesity Park Press. 1972.
8. Lynch J. M. y col. Métodos de Laboratorio. 2a. edición. México. Ed. Interamericana. 1972.
9. Palmer D. F. Complement Updated for the Clinician. Med. J., 153 (6):455, 1978.
10. Porter R. R. y Reid K. B. M. The Biochemistry of Complement. Nature, 275:699, 1978.
11. Rose R. N. y Bigazzi E. P. Methods in Immunodiagnosis. 1a. edición. U.S.A. Ed. John Wiley & Sons. 1973.
12. Weir D. M. Handbook of Experimental Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1978.
13. Wintrobe M. M. y col. Clinical Hematology. 7a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger. 1974.
14. Yachnin S. Functions and Mechanism of Action of Complement. New Eng. J. Med., 274:140, 1966.

TITULACION DE ANTICUERPOS ANTI-NUCLEARES POR
FIJACION DE COMPLEMENTO

Objetivo: Analizar el fundamento de la técnica de fijación de complemento, y aplicarla en la titulación de anticuerpos antinucleares. Determinar la importancia de la técnica de fijación de complemento, por las múltiples aplicaciones de la misma. Señalar las propiedades de los anticuerpos anti-nucleares, reconociendo otras técnicas útiles para su identificación, así como las patologías en que están involucrados.

Evaluar las ventajas, desventajas y limitaciones del método.

Generalidades: En la práctica anterior ya quedaron establecidas algunas características del complemento y su fijación.

La propiedad que tiene el complemento de fijarse a complejos antígeno-anticuerpo, se ha utilizado como un indicador indirecto de la reacción antígeno-anticuerpo, aún cuando no hay manifestaciones visibles de esta reacción (precipitación, aglutinación, etc.). La prueba de fijación de complemento, representa una técnica muy útil para determinar antígenos o anticuerpos, y su amplio uso se debe a su alto grado de sensibilidad en relación a otros métodos (10). Para que se manifieste la fijación de complemento, bastan de 0.05 a 0.1 μ g de nitrogéno del anticuerpo/ml (6).

La fijación de complemento se ha utilizado por años para estudios cualitativos y cuantitativos en microbiología e inmunología (8). Esta técnica es de gran utilidad para estudiar antígenos de transplante, usándose en la tipificación de HLA en varios substratos, como son las plaquetas y linfocitos entre otros (10). Casi todas las infecciones virales pueden

diagnosticarse mediante la fijación de complemento, que es la prueba de primera elección para los siguientes virus: Adenovirus, Varicella-Zoster, Cytomegalovirus, Arbovirus, Influenza, Sarampión, Viruela, Rubeola, Hepatitis del suero, etc.; también se usa para el estudio de rickettsias, como son las del grupo de la fiebre Q y del tifo. Detecta antígenos micóticos de Blastomyces dermatitides e Histoplasma capsulatum. En las enfermedades autoinmunes es una herramienta muy útil. En general, se utiliza para estudiar todo tipo de antígenos, solubles o particulados, proteínas carbohidratos o lípidos (8).

Los anticuerpos anti-nucleares (factores anti-nucleares o FAN), son anticuerpos dirigidos contra uno o más componentes del núcleo celular. Pueden estar dirigidos contra la membrana nuclear, el DNA de doble hélice o simple, la desoxinucleoproteína en forma soluble, el RNA, las histonas, la proteína ribonuclear, la proteína ribonuclear citoplásmica, SS-A, SS-B, Ma, el antígeno proliferante del núcleo celular y contra el antígeno nucleolar (8).

Los anticuerpos anti-nucleares, pueden descubrirse mediante varias técnicas inmunitarias como son la fijación del complemento, la hemaglutinación pasiva, la precipitación por doble inmunodifusión en agar, la inmunofluorescencia indirecta, la contrainmunolectroforesis, o la prueba de las células LE, en la cual, el material nuclear combinado con los factores anti-nucleares, es fagocitado por los leucocitos polimorfonucleares (3).

El primer método utilizado para detectar anticuerpos anti-nucleares, fue el que aprovecho el fenómeno de células LE de Hargraves. Se encontró que los factores anti-nucleares presentes inducían tal fenómeno (1).

La inmunofluorescencia es una técnica empleada comunmente para probar los factores anti-nucleares. El procedimiento

del anticuerpo fluorescente indirecto, con células nucleadas como sustrato, es muy utilizada, observándose la presencia de anticuerpos mediante fluorescencia intranuclear. Esta prueba detecta la presencia de muchos anticuerpos anti-nucleares, y por lo tanto tiene un valor limitado en la identificación de los anticuerpos importantes y patogénicos en el Lupus Eritematoso Diseminado, pues la característica de esta enfermedad, es la presencia de cantidades significativas de anticuerpos anti-DNA y anticuerpos antinucleoproteína solubles; tiene la ventaja de ser una prueba sensible, reproducible y relativamente fácil de elaborar (6).

La fijación de complemento, es un método mediante el cual la amplificación natural de la vía clásica del complemento es utilizada como un sensible mecanismo de detección para la reacción antígeno-anticuerpo de los factores anti-nucleares (7).

Fundamento: Para determinar los anticuerpos anti-nucleares en el suero del paciente, se utilizan núcleos de timo de ternera como antígeno, que se mezclan con diluciones del suero problema; el suero de cobayo que se utiliza como fuente de complemento, se añade al sistema, y tras una incubación adecuada para que se efectúe la fijación, se agregan eritrocitos de carnero sensibilizados, como sistema indicador de la fijación de complemento. La ausencia de hemólisis, indica la fijación del complemento al complejo antígeno-anticuerpo.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Timo de ternera. Suspensión de núcleos de timo.

Solución fría de sacarosa-CaCl₂.

Azida de sodio.

Solución amortiguadora de trietanolamina salina (TBS) con pH de 7.3-7.4.

Suero del paciente inactivado a 56°C durante 30 minutos.

Suero control positivo.

Suero de cobayo (complemento).

Sistema indicador, eritrocitos de carnero al 2%, sensibilizados con hemolisinas.

Material:

1 tijera.

1 matraz aforado de 1 l.

1 vaso de precipitado de 500 ml.

1 mortero.

1 gasa.

1 franela.

2 tubos estériles de 16 x 150 mm.

2 pipetas estériles de 10 ml.

12 pipetas de 1 ml.

12 tubos de 12 x 75 mm.

38 tubos de 13 x 100 mm.

1 portaobjetos.

2 tubos de centrifuga.

Equipo:

Baño de hielo.

Centrífuga.

Colorímetro Coleman Jr.

Microscopio.

Estufa a temperatura de 37°C.

METODOLOGIA

PREPARACION DE LA SUSPENSION DE NUCLEOS DE TIMO.

1. Suspender un timo de ternera (molleja) de 50 g., finamente cortado con tijera, en una solución fría de sacarosa-cloruro de calcio:

Sacarosa 85.5 g(0.25 M).

CaCl₂ · H₂O 0.441 g (0.005 M).

Agua destilada 1 litro.

2. Desmenuzar con mortero o licuar durante 4 minutos.
3. Filtrar el licuado a través de gasa, para eliminar los fragmentos de tejido.
4. Centrifugar a 2400 rpm durante 10 minutos.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Suspender el sedimento en 400 ml de la solución de saca rosa-CaCl₂.
7. Filtrar nuevamente a través de una franela.
8. Añadir azida de sodio, la cantidad necesaria para una - concentración final de 0.1%.
9. Repartir la suspensión de núcleos en alícuotas, en tubos estériles y guardar en el refrigerador.

La suspensión debe prepararse bajo condiciones de asepsia, con material estéril y siempre sobre hielo; la centrifuga debe ser refrigerada. Se puede conservar refrigerada a 4°C, sin pérdida de propiedades.

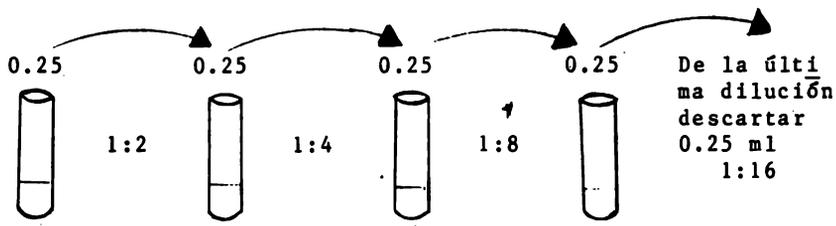
DETERMINAR LA ANTICOMPLEMENTARIDAD DE LA SUSPENSIÓN DE NÚCLEOS.

1. Hacer diluciones progresivas módulos 2X, con volumen final de 0.25 ml para cada tubo, de la suspensión de núcleos en TBS (tubos 1-10).
2. Al control negativo (tubo 11), añadir 0.5 ml de TBS.
3. Al control positivo (tubo 12), añadir 0.25 ml de TBS.
4. Titular complemento (suero de cobayo) y diluirlo con TBS, de modo que 0.25 ml contenga 3 unidades 50% hemolíticas.
5. Añadir a todos los tubos menos al número 11, 0.25 ml de la dilución de suero de cobayo (3 unidades C'H₅₀).
6. Incubar a 37°C durante 30 minutos.
7. Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos.

PASOS PARA LA FIJACION DE COMPLEMENTO

I. MEZCLAR LA SUSPENSION DE NUCLEOS CON DILUCIONES DEL SUERO.

1. Hacer diluciones progresivas, en módulos de 2X del suero control positivo, y suero del paciente, previamente inactivados, calentando 30 minutos a 56°C (para las diluciones usar TBS como diluyente, dejando un volumen final de 0.25 ml en cada tubo). Comenzar de 1:2 hasta la dilución 1:128.



2. Preparar un tubo de suero control negativo, con 0.25 ml de una dilución 1:1 de un suero negativo conocido y un tubo control para calcular la anticomplementaridad del suero problema, con 0.25 ml de la primera dilución de este suero.

3. Preparar un tubo control negativo, agregando 0.1 ml. de suero positivo, para determinar la anticomplementaridad del mismo.

4. Se requieren dos tubos para testigos positivo y negativo respectivamente, a los cuales no se les agrega nada en este paso de la reacción y permiten valorar la actividad hemolítica del complemento sobre los GRC sensibilizados con hemolisinas; es necesario también un tubo control que va a servir como testigo para calcular el 100% de hemólisis.

5. Añadir 0.25 ml de la dilución anti-complementaria de núcleos de timo a cada uno de los 7 tubos problema y a cada uno de los 7 tubos con suero control positivo.

6. Completar el volumen de cada tubo hasta 0.9 ml con 0.4 ml de TBS (ver tabla).

7. Agitar los tubos para mezclar bien el contenido de todos ellos, e incubar a 37°C durante 30 minutos, agitando los tubos a intervalos de 10 minutos.



8. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos, decantar el sobrenadante y lavar el sedimento, añadiendo 1 ml de TBS a cada tubo.

9. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos y luego descartar el sobrenadante, que lleva restos de antígeno o anticuerpo que no fueron utilizados en la reacción.

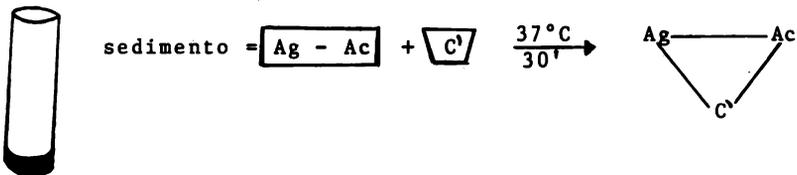
II. AÑADIR COMPLEMENTO.

1. Preparar una dilución de complemento (suero de cobayo), previamente titulada que contenga 20 unidades 50% hemolíticas por ml y añadir 0.25 ml de esta dilución a cada tubo, menos a los dos controles negativos, al testigo negativo, y al control positivo.

2. Añadir 0.65 ml de TBS, completando un volumen de 0.9 ml para cada tubo.

3. Incubar a 37°C durante 30 minutos, agitando los tubos cada 20 minutos.

4. Centrifugar a 1500 rpm durante 10 minutos; decantar los sobrenadantes a otra serie de tubos y descartar el sedimento (núcleos-anticuerpos-complemento fijado).



III. PREPARAR EL SISTEMA INDICADOR.

1. Los eritrocitos sensibilizados se preparan según los pasos 1-5 de la técnica para la determinación del complemento total 50% hemolítico.

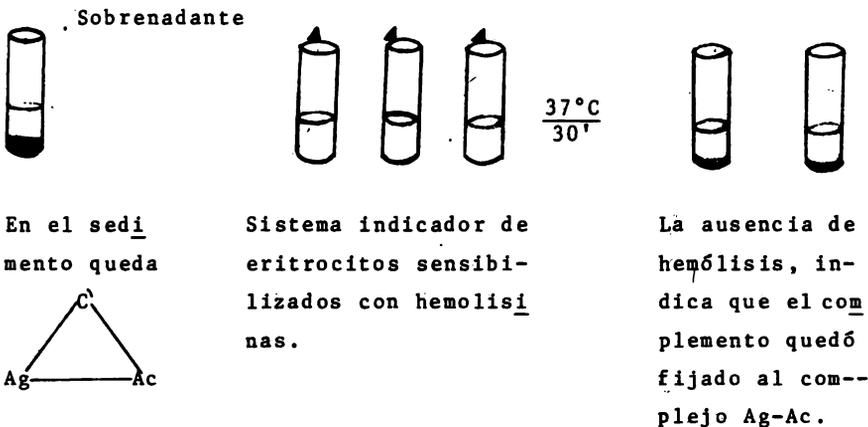
IV. AÑADIR EL SISTEMA INDICAR (ERITROCITOS DE CARNERO-HEMOLISINA).

1. A los 0.9 ml de sobrenadante que resta en cada tubo, añadir 0.6 ml de la suspensión de eritrocitos sensibilizados.

2. Agitar para que se mezcle bien el contenido de los tubos, e incubar a 37°C durante 10 minutos, agitando constantemente.

3. Añadir a cada tubo 0.5 ml de TBS, y centrifugar a 1500 rpm durante 5 minutos.

4. Leer la D.O. de cada tubo en el Colorímetro Coleman Jr. a 550 nm.



Resultados:

El título de anticuerpos anti-nucleares corresponde a la máxima dilución donde no aparece hemólisis. Cuando aparece hemólisis en todos los tubos, el suero probado no tiene fac-

tores anti-nucleares, y la fijación de complemento se efectúa con el sistema indicador de eritrocitos de carnero sensibilizados con hemolisinas, por haber quedado libre el complemento en el sobrenadante, al no ser fijado en el sedimento por la unión Ag-Ac (núcleos de timo + los factores anti-nucleares).

Deben analizarse los resultados obtenidos en los tubos testigos y de control, para detectar posibles factores de anticomplementaridad en el suero, para comprobar la actividad del complemento, así como el funcionamiento del sistema indicador, determinando en caso de existir, la autólisis y factores capaces de producir hemólisis inespecífica de la misma.



TITULO DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES = _____

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué se prepara la suspensión de núcleos de timo en condiciones de refrigeración?
2. Mencione otra población celular que puede ser utilizada como fuente de antígenos nucleares en esta determinación.
3. ¿Qué es la anticomplementaridad, y describa tres sustancias que pueden producirla?
4. ¿Cuál es el objeto de las incubaciones a 37°C, a lo largo de esta determinación?
5. ¿Por qué se determina el 100% de hemólisis en la práctica?
6. Explique el objeto de cada uno de los tubos controles utilizados en la prueba.
7. ¿Qué inmunoglobulina es más comunmente detectada con la prueba de fijación de complemento?
8. ¿Por qué se debe calentar el suero del paciente a 56°C por 30 minutos, antes de utilizarlo en la prueba?

9. Esquematice las reacciones que se llevan a cabo en la técnica de fijación de complemento.

10. Señale dos aplicaciones clínicas de la prueba de fijación de complemento.

DISCUSION

La prueba de fijación de complemento es una prueba sensible, que detecta aproximadamente 0.01 μ g de nitrógeno del anticuerpo/ml, resultando más sensible que la aglutinación y la precipitación, pero menos que el radioinmunoanálisis, la inmunofluorescencia o el ELISA. No se requiere material y equipo sofisticado en esta determinación.

Teóricamente, la fijación de complemento es un procedimiento sencillo, pero se complica en la práctica, porque los resultados exactos dependen de la acción del complemento y de cualquier factor que puede afectar su acción, incluyendo el número de eritrocitos, la calidad y cantidad de la hemolisina, y ciertos parámetros del sistema de reacción que incluyen fuerza iónica, el pH, la concentración de Ca^{++} y Mg^{++} , el tiempo de incubación y la temperatura.

Un exceso de hemolisina causa hemaglutinación, y poca cantidad de como resultado anticuerpos insuficientes para efectuar la lisis celular completa; se debe titular cada nuevo lote de hemolisinas, de eritrocitos y de complemento.

La concentración de antígeno debe ser controlada, porque para una fijación de complemento óptima, debe existir una equivalencia aproximada entre el antígeno y el anticuerpo.

Si los reactivos involucrados en la reacción están impuros, la reacción puede quedar afectada, por lo cual se utilizan controles para todos los componentes, permitiendo detectar factores anticomplementarios, hemólisis no específicas, la fuerza del complemento y la autólisis de los eritrocitos.

La desventaja de esta técnica es fundamentalmente el tiempo requerido para la determinación y para la titulación de cada reactivo implicado. Se requieren grandes cantidades de reactivos, por lo cual esta prueba no es económica. Se han desarrollado técnicas comerciales de microtitulación.

Los factores anti-nucleares se encuentran comunmente en otras enfermedades, además del Lupus Eritematoso Diseminado y enfermedades reumáticas, por lo cual su especificidad diagnóstica es baja, pero útil para hacer la exclusión de pacientes con sospecha de Lupus Eritematoso Diseminado, siendo recomendable realizar determinaciones de anticuerpos anti-nucleares específicos, para diferenciar las patologías.

BIBLIOGRAFÍA

1. Gell P.G.H., Coombs R.R.A. y Lachmann P.J.. Clinical Aspects of Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. - Blackwell Scientific Pub. 1975.
2. Gordon L.B. Lo Esencial de la Inmunología. 2a. edición. México. Ed. El Manual Moderno. 1975.
3. Greenwald C.P. y col. Current status of Laboratory Tests for Antinuclear Ab (ANA) in the evaluation of Rheumatic Diseases. Lab. Med., 9:19, 1978.
4. Nakamura R.M. t Tan M.E. Recent progress in autoantibodies to nuclear antigens (ANA). Hum. Pathol., 9:85, 1978.
5. Notman D.D., Kuvata D. y Tan M.E. Profiles of antinuclear antibodies systemic rheumatic diseases. Ann. Intern. Med., 83:464, 1975.
6. Peacock E.J. y Tomar H.R. Manual of Laboratory Immunology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger. 1980.

7. Robbins C.W. y col. Complement Fixation with Cell Nuclei and DNA in Lupus Erythematosus. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 96:575, 1957.

8. Rose R.N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.

9. Swaak A.J.G. y col. Anti-ds DNA and complement profiles as prognostic guides in Systemic Lupus Erythematosus. Arthritis Rheum., 22:226, 1979.

10. Todd C. J. Sanford H.S y Davidsohn B.B. Clinical Diagnosis and Management. 14a. edición. U.S.A. ed. W.B. Saunders Co. 1979.

LINFOCITOS

Los linfocitos se clasifican en dos categorías mayores: los linfocitos T derivados del timo, responsables de la inmunidad celular, y los linfocitos B derivados de la médula ósea, responsables de la inmunidad humoral. La autonomía de estas dos divisiones no es completa, porque frecuentemente las funciones de los linfocitos T y B son interdependientes.

Entre los linfocitos existe una gran diversidad en cuanto a sus propiedades biológicas y químicas, como son el tamaño, la densidad, la carga, la estructura superficial y la función. En años recientes se han realizado muchas investigaciones de la estructura superficial y función de los linfocitos, con objeto de definir su papel en la respuesta inmune, y desarrollar métodos con pruebas "in vitro", como auxiliares en el diagnóstico de enfermedades humanas.

En el hombre, es irrefutable la evidencia de dos poblaciones generales de linfocitos, con funciones marcadamente distintas. Como evidencia quedan incluidas las observaciones clínicas de niños nacidos con deficiencias de cada población, observaciones directas de las estructuras superficiales encontradas en cada grupo, diferencias de movilidad electrofórica, funciones claramente diferentes en los análisis "in vitro", localización de las células en las distintas áreas de los órganos linfáticos primarios y secundarios, y la demostración de marcadores de superficie aparentemente únicos de cada tipo celular, que ha permitido dividir a los linfocitos en varias subpoblaciones.

Se ha encontrado que los linfocitos B típicos, tienen inmunoglobulina mIg detectable en su membrana, antígenos Ia, dos tipos de receptores para el complemento y más de tres tipos de receptores para las regiones Fc de IgG, IgM e IgE. -

Los linfocitos T no tienen antígeno Ia, receptores de complemento y de la región Fc de IgE, detectables; se reconocen por la formación de rosetas con eritrocitos de borrego, propiedad que no tienen los linfocitos B. Se han encontrado otras subpoblaciones de linfocitos, como la que está caracterizada por tener receptores para Fc, ausencia de mIg y de la propiedad de formar rosetas "E" y como la subpoblación caracterizada por no tener ningún marcador de tectable y cuyos linfocitos se denominan células nulas.

Para detectar cada una de estas subpoblaciones se han desarrollado métodos especiales, y su elección depende de las demandas de la investigación o de sus requerimientos prácticos en un laboratorio clínico.

Estas determinaciones son útiles para conocer la presencia de una proliferación maligna en los linfocitos sanguíneos; el carácter de las células B o T determina la diversidad clínica del grupo de linfomas y sarcomas del retículo celular y con la evaluación de ellas, puede seguirse la respuesta terapéutica; son útiles para la investigación de una deficiencia primaria del sistema inmune, y se usan también para estudiar una gran variedad de enfermedades agudas y crónicas asociadas con alteraciones del sistema inmune.

Entre las técnicas más utilizadas para distinguir y cuantificar las diversas poblaciones de linfocitos, están la formación de rosetas y la inmunofluorescencia.

INMUNOCITOADHERENCIA. FORMACION DE ROSETAS "E"

Objetivo: Realizar la formación de rosetas "E" con linfocitos T de un ratón inmunizado previamente con eritrocitos de carnero. Analizar el fundamento de la inmunocitoadherencia, considerando la utilidad que tiene en la cuantificación de los linfocitos T y B y los avances que proporciona en la investigación de la respuesta inmune.

Evaluar las condiciones y el criterio a seguir, en la elaboración y cuantificación de rosetas, y reconocer las ventajas y limitaciones del método.

Generalidades: Los linfocitos humanos, se han dividido en dos poblaciones principales B y T, por analogía con los linfocitos de otras especies de mamíferos y aves (1).

En la década de los cincuentas, se encontró la presencia de receptores específicos en los linfocitos, expresados en forma de aglutinación de superficie, y fue Biozzi y colaboradores en 1964, quienes mostraron las rosetas formadas por eritrocitos alrededor de células linfoides de ratón, sensibilizadas previamente con eritrocitos de borrego (7).

La interfase de la superficie celular, es una compleja estructura móvil, que funciona reconociendo ciertos materiales extracelulares y que transmite información generada por el reconocimiento por parte de los organelos subcelulares (8). Estas características de las superficies celulares de los linfocitos, determinan el camino mediante el cual los materiales extraños se reconocen, influyendo en la generación de la respuesta inmune ante estos materiales. Los receptores antigénicos de los linfocitos T y B, son esenciales para generar respuestas inmunes específicas (5).

Los linfocitos T, son aquellos que han sido procesados por el timo, y que después aparecen en los tejidos periféri

cos linfoides, concentrados en la región paracortical de los nódulos linfáticos y en la pulpa blanca del bazo (2).

Los linfocitos B, tienen su origen en sitios extratímicos (médula roja e hígado fetal), y no son procesados por el timo; se encuentran en, o cerca de centros germinales de tejidos extratímicos linfoides y sirven como precursores de células efectoras; maduran originando células plasmáticas productoras de anticuerpo (2).

Mediante la formación de rosetas, se detectan en los linfocitos B receptores para el complemento "EAC", en tanto que para los linfocitos T, se detectan receptores para eritrocitos de borrego "E" (9).

Para estudiar los receptores de linfocitos, se han desarrollado varias técnicas, entre las cuales cabe mencionar las que utilizan antisuero heterólogo, marcado radioactivamente o con fluoresceína (8).

La formación de rosetas es una técnica que ha sido utilizada para identificar y cuantificar las células linfoides en la investigación de enfermedades (9). Estos estudios se utilizan principalmente en enfermedades linfoproliferativas, como es el caso de la leucemia linfocítica crónica, donde la mayoría de los linfocitos en sangre son células B (2). También se utiliza en inmunodeficiencias, ejemplificado con la deficiencia inmunológica tipo Bruton, donde se encuentran generalmente un número pequeño de células B circulantes (9). En enfermedades infecciosas se usa esta técnica, como en el caso de mononucleosis infecciosa, donde un gran número de linfoblastos tienen marcadores de células T, y un pequeño número de marcadores de células B (3). Se aplica también para la investigación de enfermedades autoinmunes, donde se tiene al Lupus Eritematoso Diseminado (3). Podemos citar además por su particular interés, la en

fermedad de Hodgkin, la leucemia linfocítica aguda, el síndrome de Sezary, y el cáncer entre otros (1).

La prueba de formación de rosetas "E", provee un método para cuantificar el número de células linfoides T, que tienen receptores específicos de eritrocitos en su superficie, siendo útiles las rosetas como marcadores de las células T. Se han usado diferentes clases de pruebas "E" y - muy probablemente, la marcada divergencia de resultados publicados, se debe a diferentes técnicas y criterios para seleccionar rosetas positivas.

En general, el criterio y las precauciones que deben establecerse para la validez de un marcador, incluyen los siguientes puntos de interés que han sido publicados por el W.H.O. (2):

1. Utilizar eritrocitos que no tengan más de dos semanas de colectados, en solución Alsever, almacenados a 4°C.
2. Es necesario tener una proporción entre eritrocitos y linfocitos de 50:1, y es recomendable la proporción 100:1. La reacción se debe llevar a cabo en tubos redondos de plástico o vidrio siliconizado, no cónicos. Las células pueden ser suspendidas en una variedad de soluciones salinas (Hank, Eagle, etc.)
3. La presencia de proteínas en el medio aumenta la estabilidad de las rosetas, como es el caso del suero de ternera fetal.
4. Se han obtenido resultados reproducibles, incubando a 37°C seguido de centrifugación a 200 g., durante 5 minutos e incubación a 4°C durante la noche. Parece sin embargo, - que el periodo de incubación en frío puede ser acortado a 1 o 2 horas; se utiliza también un método usando centrifugación e incubación a temperatura ambiente durante una hora. Es recomendable que los diferentes métodos se comparen y la

técnica que de resultados más reproducibles y mayor número de células positivas, sea adoptada.

5. La resuspensión final de rosetas para conteo, no debe ser muy vigorosa. Golpear ligeramente el tubo con el dedo es suficiente y pipetear cuidadosamente con una pipeta Pasteur ancha.

6. El número de eritrocitos adheridos a los linfocitos varía. Bajo condiciones óptimas, la gran mayoría de células T normales, se unen a 3 o más eritrocitos y el número de linfocitos con uno o dos eritrocitos unidos es pequeño. Ahora bien, como este último grupo puede estar aumentado en algunos pacientes, se recomienda registrar las lecturas de rosetas con más de 5 eritrocitos adheridos, o con uno o dos separadamente.

El estudio de los marcadores de superficie del linfocito, es la parte central de la Inmunología Celular, siendo este un campo complejo y en constante cambio; recopilándose día a día mayor información, obteniéndose mejores condiciones de trabajo, y encontrándose una amplia variedad de marcadores que están siendo muy útiles en el aspecto diagnóstico de enfermedades linfoproliferativas (6).

Fundamento: La formación de rosetas "E" se lleva a cabo mezclando en un medio líquido, células de bazo (ricas en linfocitos T) de un animal inmunizado previamente con eritrocitos de carnero, con el antígeno inmunizante (eritrocitos de carnero); tras una incubación adecuada, se cuenta el número de células linfoides con eritrocitos adheridos a los receptores de superficie, que demuestran la sensibilización de los linfocitos.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Material biológico:

1 ratón inmunizado por vía intraperitoneal, practicando

la primera inmunización con 0.5 ml de eritrocitos de carnero al 40%, y la segunda, con por lo menos 5 días de intervalo entre la primera, aplicando 0.5 ml de eritrocitos de carnero al 20%, 3 días antes de realizar el experimento. La inmunización se debe efectuar por los alumnos.

1 ratón de control, inyectado al mismo tiempo con 0.5 ml de suero fisiológico estéril.

Reactivos:

Medio mínimo esencial de Eagle (MEM) o solución de Hank.
Eritrocitos de carnero.

Amortiguador salino de fosfatos con pH 7.4, 0.15 M.

Material:

- 2 cajas de Petri.
- 2 tubos de centrifuga (no cónicos).
- 2 tubos de ensayo de 12 x 75 mm.
- 2 pipetas de 1 ml.
- 2 pipetas de 10 ml.
- 2 pipetas Pasteur.
- 2 portaobjetos con cubreobjetos.
- 1 jeringa de 1 ml. con aguja del 21 al 23.
- 1 hemocitómetro.
- 1 tijeras finas.
- 2 agujas de disección.

Equipo:

- Microscopio.
- Centrifuga.

METODOLOGIA

1. Lavar los eritrocitos de carnero 3 veces en amortiguador salino de fosfatos con pH 7.4.
2. Resuspender los eritrocitos lavados, 0.2 ml en 10 ml

de amortiguador salino de fosfatos con pH 7.4.

3. Sacrificar el ratón y extraer el bazo.
4. Colocar el bazo en una caja de Petri, con 2 ml de MEM o solución de Hank y picarlo finalmente con las tijeras disgregando los trozos grandes con agujas de disección.

Romper los racimos de células, aspirándolas a través de jeringa y aguja, procurando no maltratarlas.

5. Colocar la suspensión en un tubo de centrifuga, desechando los trozos grandes que sedimentan, y centrifugar el sobrenadante a 400 rpm.
6. Resuspender el paquete de células en 3 ml de MEM o Hank.
7. Contar en hemocitómetro, ajustando la concentración a 10^6 células/0.1 ml.
8. Colocar 0.9 ml de eritrocitos de carnero (paso 2) en un tubo de centrifuga.
9. Añadir a dicho tubo 0.1 ml de células de bazo (paso 7).
10. Incubar a temperatura ambiente por 1 hora y centrifugar a 400 o 500 rpm, 15 minutos (paso optativo).
11. Si se omite el paso 10, colocar el tubo 1 hora a 4°C.
12. Con una pipeta capilar, suspender el paquete de células y colocar una pequeña alicuota en el hemocitómetro. Contar las células formadoras de rosetas (linfocitos con 3 o más eritrocitos adheridos), que estén presentes en las 4 esquinas grandes de la cámara.

Resultados:

- _____ Células formadoras de rosetas en la 1a. esquina.
_____ Células formadoras de rosetas en la 2da. esquina.
_____ Células formadoras de rosetas en la 3a. esquina.

_____ Células formadoras de rosetas en la 4a. esquina.

_____ Células formadoras de rosetas en las 4 esquinas.

Multiplicar el número anterior por 2500 (factor de dilución) = _____ número de células positivas por 10^6 células de bazo.

Conservar la suspensión 12 horas a 4°C y volver a contar. Si se observa baja concentración de eritrocitos de carnero, repetir desde el paso número 8, aumentando la concentración de eritrocitos.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es el objeto de inmunizar al ratón en esta práctica?
2. ¿Qué objeto tiene lavar los eritrocitos de carnero en esta técnica?
3. ¿Por qué se utiliza el bazo como fuente de linfocitos?
4. ¿Cómo puede inhibirse la formación de rosetas y por qué?
5. ¿Qué efectos tiene la temperatura en la formación de rosetas?
6. ¿Cuál es el objeto de conservar la suspensión 12 horas a 4°C y volver a contar?
7. ¿Por qué se deben contar únicamente linfocitos con 3 o más eritrocitos adheridos?
8. De dos ejemplos de sustancias con las cuales pueden ser recubiertos los eritrocitos para la formación de rosetas.
9. ¿Por qué la resuspensión final de rosetas para conteo debe ser muy vigorosa?
10. Mencione otros marcadores de la superficie celular y explique alguna otra técnica empleada para su estudio.

DISCUSION

Dentro de las ventajas de esta técnica, podemos mencionar que se requiere poco material, que la elaboración es sencilla, es de bajo costo, los reactivos son fácilmente accesibles y tiene importancia por su aplicación en investigaciones de la respuesta inmune. Entre los inconvenientes cabe mencionar que no es muy específica; existen una variedad de criterios en la cuantificación de las rosetas y por lo tanto, existen heterogeneidad en los resultados que reportan las diferentes referencias.

Existen otros métodos más sofisticados y más específicos como es el caso de la inmunofluorescencia, que requiere de reactivos e instrumentación especiales.

Es conveniente enumerar los linfocitos T, expresándolos en porcentaje así como también, en números absolutos.

Se ha observado que los resultados obtenidos dependen del progreso de la respuesta inmune; varían con la temperatura, con el grado de agitación, cambio de diámetro de los tubos de centrifuga y otras variables como serían también la concentración de eritrocitos y de linfocitos; así como el volumen del medio, que pueden alterar significativamente el número y la morfología de las rosetas.

Mediante ciertas técnicas, como es la de velocidad de sedimentación, pueden separarse las rosetas de otras células en base a su tamaño, permitiendo aislar a los linfocitos para estudios que posteriormente deseen realizarse.

En general, la fácil aplicación de las observaciones experimentales en el estudio de enfermedades humanas, es sumamente importante, y por lo tanto el análisis de subpoblaciones de linfocitos, es un necesario aspecto de la medicina clínica moderna.

BIBLIOGRAFIA

1. Aisenberg C. A. Cell-Surface Markers in Lymphoproliferative Diseases. New Engl. J. Med., 304:331,1981.
2. Aiuti F. y col. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Report of a WHO Sponsored Workshop on human B and T cells. July 15,1974.
3. Gell P. G. H., Coombs R. R. A. y Lachmann P. J. Clinical Aspects of Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
4. Gyongyossy M. y Playfair J. Rosette Formation by Mouse Lymphocytes. Clin. Exp. Immunol.,18:169,1974.
5. Hunter P., Munro A. y Mc. Connell I. Properties of educated T cells for rosette formation and cooperation - with B cells. Nature,236:52,1972.
6. Kerbel S. R. Increased Sensitivity of Rosetting Assay for Fc Receptors Obtained by Using Nonhemagglutinating Monoclonal Antibodies. J. Immunol. Methods,34:1,1980.
7. Rose R. N. y Bigazzi E. P. Methods in Immunodiagnosis. 1a. edición U.S.A. Ed. John Wiley & Sons. 1973.
8. Rowlands T. S. y Daniele P. R. Surface Receptors in the Immune Response. New Engl. J. Med.,293:26,1975.
9. Weir D. M. Handbook of Experimental Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1978.
10. Wilson D. J. The Relationship of Antibody Forming - Cells to Rosette forming Cells. Immunology,21:233,1971.

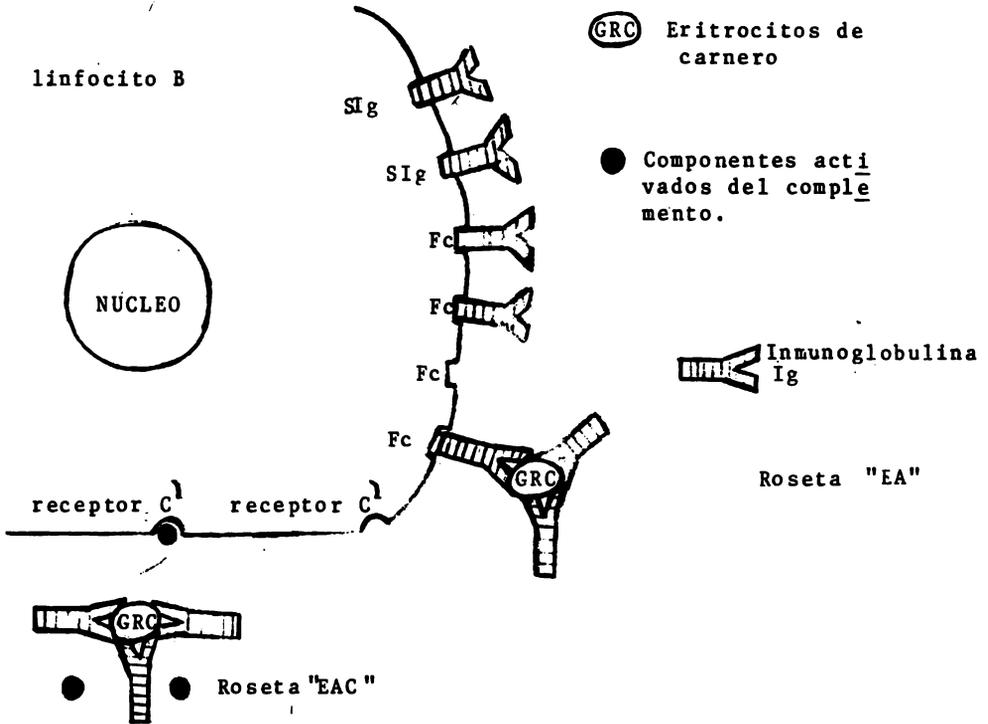
SEPARACION DE LINFOCITOS T Y B EN SANGRE PERIFERICA

Objetivo: Realizar la separación de linfocitos T y B de la sangre periférica, mediante la técnica de centrifugación por densidad con Ficoll-Hypaque, y posteriormente realizar la formación de rosetas, para estudios cuantitativos, analíticos y funcionales de ambas poblaciones. Analizar las diferencias que existen entre las dos poblaciones de linfocitos, mediante las cuales es posible separarlos y enumerarlos. Comparar con otras metodologías usadas y evaluar las limitaciones de esta técnica a desarrollar, así como las ventajas que ofrece.

Generalidades: Algunas propiedades fundamentales de los linfocitos B y T, que deben tomarse en cuenta para una mejor comprensión de la práctica, son las siguientes (1):

Características	Linfocitos B	Linfocitos T
Origen	Médula osea	Médula osea
Sitio de procesamiento	La bursa en las aves	Timo
Localización en el nódulo linfático.	Folículo Cordón medular	Paracortex (cortex profundo)
Funciones	Célula efectora en la síntesis de anticuerpos.	Célula efectora en la inmunidad celular. Célula reguladora (ayuda o supresión)
Subtipos identificados	Célula del centro folicular. Linfocitos del cordón medular.	Célula supresora citotóxica. Célula inductora de ayuda.
% de células sanguíneas periféricas.	10-15% de linfocitos pequeños.	75-80% de linfocitos pequeños.
Marcadores de superficie más confiables.	Inmunoglobulinas de superficie.	Formación de rosetas espontáneas con GRC (Rosetas "E")

RECEPTORES EN LA SUPERFICIE DE LAS CELULAS B(6).



En la práctica anterior, quedó ya establecido el fundamento para la formación de rosetas "E", en la identificación de linfocitos T.

Los linfocitos B, tienen receptores de membrana para C_3 . La técnica de formación de rosetas "EA", depende de la capacidad de los linfocitos B, de formar rosetas con eritrocitos recubiertos de complemento (3). Las células indicadoras son eritrocitos de carnero tratados con anticuerpos frente a ellos, y complemento humano. También los PMN y los monocitos pueden formar rosetas "EAC" (2). Pero las células B, aparecen pequeñas, con una capa simple de eritrocitos adheridos (3).

La formación de rosetas puede ser inhibida agregando antiglobulina, indicándose con esto, que los receptores son Ig (7).

Cualquier partícula que contenga en su superficie o que pueda ser recubierta con determinantes antigénicos, puede ser utilizada en una prueba directa de rosetas (8).

Los linfocitos B pueden ser identificados también, de mostrando inmunoglobulina en la superficie de su membrana, utilizando suero antihumano con inmunoglobulina marcada con fluoresceína o utilizando un suero con inmunoglobulina no marcada, en una especie animal particular, seguido por un suero antiespecie marcado con fluoresceína (11). Además de los dos marcadores ya mencionados, existe una amplia variedad que han sido utilizados, con la finalidad de identificar, enumerar y aislar los linfocitos B y T (9).

Para que un marcador tenga validez, deben tomarse en cuenta los siguientes puntos (2):

a) Debe determinar la expresión del marcador en B, T, u otra población o subpoblación celular.

b) El sistema marcador, debe ser titulable hasta un punto de saturación, que defina las distintas poblaciones o subpoblaciones.

c) Bajo ciertas condiciones, como es la rápida proliferación, habrá diferencias en la expresión del marcador. Si es posible la expresión del marcador en células B y T normales, bajo condiciones similares deberá ser verificada.

Algunos marcadores no son exclusivos de células linfoides. La mayor dificultad práctica, es ocasionada por los monocitos, que pueden acarrear IgG citofílico (3).

Para aislar linfocitos de la sangre, se han reportado numerosos métodos. Entre ellos, el método más comunmente uti

lizado, es el de Ficoll-metrizoato de sodio, descrito por Boyum (2).

Ninguna técnica de separación, tiene una eficacia mayor del 90%. En el método de Ficoll-Metrizoato de sodio, existe una pérdida preferencial de células T (4).

Estas preparaciones, contienen una alta proporción de monocitos; estos, acarrean algunos marcadores en común con las células linfoides pero pueden ser fácilmente distinguidos por su morfología general (11).

A continuación se muestran algunos métodos usados en la separación de linfocitos B y T humanos (2):

A) Utilizando marcadores de sup. definidos.

		<u>Eficacia</u>
1. Antisuero citotóxico ej.	Anti-Ig Anti-T Anti-B	Alta
2. Sedimentación de rosetas.	E EA EAC	Variable, pero puede ser alta.
3. Columna de fraccionamiento. ej.	Degulan anti-Ig Degulan anti-Ig+Ig Sephadex anti-Ig Sephadex espaciado anti-Ig	Moderada Alta
4. Monocapas absorbentes.		Alta
5. Tipo de células activadas fluorescentemente ej.	Anti-Ig Anti-T Anti-B	Alta

B) Usando propiedades generales

	<u>Eficacia</u>
1. Electroforesis	Un grado de separación es posible.

2. Gradiente de densidad

3. Velocidad de sedimentación a 1 g.

Los linfocitos B son efectivamente removidos. Eficacia moderada. (25-70%).

4. Columnas de adherencia, fibra de nylon.

Entre los métodos más usados se encuentran las columnas de adherencia con fibra de nylon.

Fundamento: En esta práctica, se efectuará la separación de linfocitos de la sangre, en base a la centrifugación de densidad, utilizando un gradiente de Ficoll-Hypaque, y posteriormente se procederá a identificarlos y enumerarlos, utilizando la propiedad de formación de rosetas "E" y rosetas - "EAC" (3).

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Ficoll 400 (PM 400 000 sigma), 6.48 g en 72 ml de agua - destilada, con Hypaque al 50% (21 ml).

Amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.

Eritrocitos de carnero.

Sangre humana heparinizada.

Solución del nuevo azul de metileno al 0.5%.

Material:

8 tubos de 13 x 100 mm.

5 pipetas de 1 ml.

3 pipetas de 5 ml.

2 pipetas de 10 ml.

6 pipetas Pasteur.

2 tubos de centrifuga.

1 hemocitómetro.

Equipo:

Estufa a temperatura de 37°C.

Centrífuga.

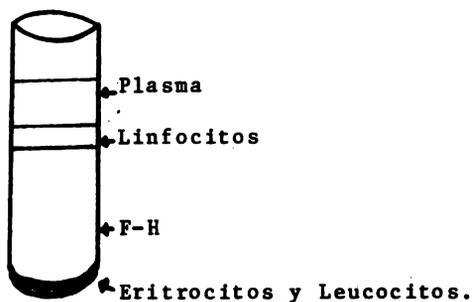
Microscopio.

METODOLOGIA

1. Obtener 4-5 ml de sangre humana heparinizada (0.35 ml de heparina) y diluirla 1:2 con amortiguador salino de fosfatos.

2. Pasar por Ficoll-Hypaque la sangre diluida, colocando en un tubo de centrifuga 3 ml de Ficoll-Hypaque y 4 ml. de sangre diluida; centrifugar a 1 700 rpm durante 45 minutos. La densidad del Ficoll-Hypaque debe encontrarse en un rango de 1.07-1.08.

Estratificar la sangre, deslizándola lentamente por las paredes del tubo sin mezclar.



3. Separar la interfase cuidadosamente con una pipeta Pasteur y lavar los linfocitos tres veces con amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2 (4-5 ml en cada lavado), centrifugando a 1 700 rpm por 7 minutos.

4. Ajustar la concentración de células viables a 4×10^6 /ml. (En el segundo lavado dejar + 1 ml, añadir un ml. de la

solución del nuevo azul de metileno y contar un cuadro para leucocitos en el hemocitómetro. El resultado se multiplica por 20 000 para conocer la concentración obtenida).

5. Tomar 1 ml del paquete de eritrocitos de carnero preservados en solución de Alsever v/v (por lo menos durante una semana).
6. Lavar el paquete tres veces con amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2, centrifugando a 1 500 rpm (preparación previa).
7. Hacer una suspensión al 1% con amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.
8. Mezclar 0.25 ml de linfocitos y colocar 0.2 ml en dos tubos.
9. Incubar en la estufa a 37°C, por 15 minutos.
10. Centrifugar a 800 rpm, durante 5 minutos.
11. Incubar en baño de hielo, 2 horas.
12. Hacer lectura al microscopio, contar rosetas de linfocitos con 3 o más eritrocitos de carnero adheridos.

Leer el primer tubo después de dos horas de incubación. Leer el segundo tubo después de cuatro a cinco horas de incubación.

ROSETA B

1. Seguir hasta el paso 6.
2. Hacer una suspensión de eritrocitos de carnero al 5% en hemolisinas con dilución apropiada.
3. Incubar a 37°C, en la estufa por 30 minutos. Lavar 2 veces.
4. Añadir un volumen igual al inicial de complemento fresco, diluido 1:200 en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.

5. Incubar a 37°C por 30 minutos.
6. Lavar 2 veces.
7. Ajustar al 1% con amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.
8. Mezclar 0.25 ml de eritrocitos de carnero, con 0.25 ml de linfocitos.
9. Dejar 15 minutos a temperatura ambiente.
10. Centrifugar 5 minutos a 800 rpm.
11. Resuspender suavemente los paquetes.
12. Observar al microscopio. Leer directamente.

Nota: Los eritrocitos de carnero tratados, pueden utilizarse al día siguiente.

Resultado:

Reportar el % de linfocitos formadores de rosetas "E", en relación con toda la población presente en el hemocitómetro. Es recomendable contar 100 células, para obtener datos más precisos.

_____ % de linfocitos T.

Reportar el % de linfocitos formadores de rosetas - - "EAC", en las mismas condiciones que se siguieron en la cuenta de linfocitos T.

_____ % de linfocitos B.

Según comunicación del WHO, los resultados oscilan entre 50-70% para los linfocitos T y 20-30% de linfocitos B. En México existe discrepancia en los resultados reportados, por lo cual no se ha fijado un valor de referencia.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la composición del reactivo Ficoll-Hypaque, y

con que objeto se utiliza en esta práctica?

2. ¿Por qué deben ser preservados los eritrocitos en solución de Alsever, por lo menos una semana antes de su utilización?
3. ¿Qué utilidad tendría el uso de azida de sodio en la práctica?.
4. ¿Por qué sería conveniente tratar los eritrocitos con neuraminidasa previamente?
5. ¿Cómo debe calcularse la cantidad de hemolisina que requiere utilizarse en la formación de rosetas "EAC"?
6. ¿Cómo se efectúa la formación de rosetas "EA"? /
7. Mencione otros tres marcadores de linfocitos diferentes a los mencionados previamente:
8. Actualmente ¿se considera que las células formadoras de placa, y las células formadoras de rosetas "EAC" son una misma población? ¿Por qué?
9. ¿Cuál es el papel del macrófago en la inmunidad humo--ral e inmunidad celular?
10. Explique alguna contribución de los marcadores de superficie en medicina.

DISCUSION

Esta técnica de centrifugación por densidad, permite separar a las células linfoides de los demás componentes sanguíneos; posteriormente se procede a realizar las técnicas de -formación de rosetas, con objeto de separar y cuantificar las dos poblaciones: los linfocitos B y T.

Esta es una prueba con las ventajas de ser económica y requerir relativamente poco tiempo en su elaboración. Presenta un alto grado de sensibilidad, lo resultados son bastante reproducibles y permite medir posteriormente la actividad funcional de la fracción celular obtenida.

La identificación y enumeración de los linfocitos B y T en sangre y otros tejidos, tiene particular valor en el estudio de las enfermedades linfoproliferativas, en inmunodeficiencias, en enfermedades autoinmunes e infecciosas y la separación de ambas poblaciones es muy utilizada para realizar estudios y tipificaciones de los antígenos HLA en el campo de la inmunología de transplantes.

El reactivo de Ficoll-Hypaque es económico, no es tóxico ni interfiere con las funciones de las células probadas, y es inerte, por lo cual no altera la carga de las proteínas en la superficie de membrana.

Los reactivos utilizados son delicados. El pH de las soluciones amortiguadoras debe ser vigilado, porque los eritrocitos son muy sensibles. Se pueden emplear eritrocitos de distintas especies animales, pero varían los requerimientos, teniéndose que cuidar las condiciones de almacenamiento e isotonicidad, para su utilización en las rosetas. El radio óptimo de eritrocitos por célula nucleada, la concentración, el volumen y la fuerza de centrifugación, deben ser estandarizados.

Algunas rosetas son inestables y se disocian en minutos después de ser resuspendidas; al agregar azida de sodio se previene la disociación, que puede ocurrir también por la centrifugación.

BIBLIOGRAFIA

1. Aisenberg C. A. Cell-Surface Markers in Lymphoproliferative Diseases. New Engl. J. Med., 304:331, 1981.
2. Aiuti F. y col. Identification, enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. Report of a WHO Sponsored Workshop on human B and T cells, July 15, 1974.

3. Cherchi M. y Catovsky D. Mouse RBC rosettes in chronic lymphocytic leukaemia: different expression in blood and tissues. Clin. Exp. Immunol., 39:411,1980.
4. Lefkovitz I y Cosenza H. Immunological Methods. 1a. edición. U.S.A. Ed. Academic Press Inc. 1979.
5. Francois J. y col. In vivo specific Antigen Recognition by Rosette-Forming Cells. Nature, 227:1251,1970.
6. Gyongyossy M. y Playfair J. Rosette Formation by Mouse Lymphocytes. Clin. Exp. Immunol., 18:169,1974.
7. Kerbel S. R. Increased Sensitivity of Rosetting Assay for Fc Receptors Obtained by Using Nonhemagglutinating Monoclonal Antibodies. J. Immunol. Methods, 34:1, 1980.
8. Romagnani S. Rosette Formation with Protein A-Coated Erythrocytes: A Method for Detecting both IgG-Bearing Cells and another subset of Human Peripheral Blood B Lymphocytes. J. Immunol. Methods, 33:11, 1980.
9. Rowlands T. D. y Daniele P. R. Surface Receptors in the Immune Response. New Engl. J. Med., 293:26,1975.
10. Srinvasa U. N. T. y col. The Effect of Temperature-Dependent Autorosettes on B/T Cells Ratios of Purified Rabbit Peripheral Blood Lymphocytes. J. Immunol. Methods, 33:201, 1980.
11. Weir D. M. Handbook of Experimental Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1978.
12. Wilson D. J. The Relationship of Antibody-Forming -- Cells to Rosette-Forming Cells. Immunology.21:233,1971.

CUANTIFICACION DE CELULAS FORMADORAS DE ANTI-
CUERPO. MODIFICACION DE LA TECNICA DE JERNE

Objetivo: Demostrar la capacidad individual de las células linfocíticas de un animal inmunizado recientemente contra un antígeno, de secretar anticuerpo específico al medio, lisando células blanco en presencia de complemento, utilizando una modificación de la técnica de Jerne. Reconocer algunas modificaciones que se han desarrollado a partir de la técnica original, evaluando la utilidad de la misma en el campo de Inmunología experimental y clínica, considerando las limitaciones y ventajas de su aplicación.

Generalidades: En 1963, Jerne y Nordin desarrollaron una técnica con la cual las células formadoras de anticuerpo (CFA), pueden determinarse funcionalmente "in vitro", mediante la propiedad que tienen los anticuerpos producidos, de fijar complemento después de haberse unido a un antígeno (2,3).

Este método original es solamente adecuado para determinar la formación de IgM, y se conoce con el nombre de técnica directa (9).

Cuando se requiere determinar alguna otra inmunoglobulina, por ejemplo IgG, se agrega a la placa un anticuerpo antiglobulina gamma de la especie de donde provienen las células linfocíticas, y se conoce como técnica indirecta (9).

La técnica sirve para evaluar directamente la respuesta humoral contra cualquier antígeno capaz de adherirse a la membrana de los eritrocitos de cualquier especie, tal como se hace en la hemaglutinación pasiva, a reserva de que el procedimiento de acoplamiento, deje al eritrocito sensible a la lisis. Esta modificación proporciona mayor versatilidad al método por en cuanto a los antígenos que pueden probarse, habiéndose desarrollado técnicas para unir casi cual-

quier antígeno a los eritrocitos, incluyendo proteínas, polisacáridos y haptenos.

Esta técnica permite evaluar directamente la respuesta humoral desde su inicio; es capaz de medir los anticuerpos circulantes que mediante otras técnicas se detectan hasta que se acumulan en mayor concentración (5). Permite revisar grandes poblaciones celulares, por lo cual es muy utilizada a nivel experimental en múltiples estudios de la respuesta inmune, en un gran número de vertebrados que incluyen además de mamíferos, anfibios, reptiles, aves, peces, etc. (8). En la actualidad se aplica principalmente en estudios a nivel humano.

Como herramienta de experimentación, esta técnica ha permitido estudiar múltiples facetas de la respuesta humoral que incluyen la relación de esta última con la respuesta celular (6); se ha podido seguir la alteración de la función de las células B por diversos factores tales como los fármacos, los virus, parásitos, etc. (8); se ha estudiado la evolución de la respuesta inmune en función del tiempo, llegándose a conocer así el intervalo requerido para obtener una respuesta inmune óptima (6); ha hecho posible la observación de los experimentos "in vivo", "in vitro" (7); las CFA han podido ser reconocidas y recuperadas para obtener un crecimiento subsecuente en cultivos (5); ha podido seguirse la respuesta primaria y la secundaria (6); ha servido en la investigación de las propiedades del complemento y del factor anticomplementario (4); ha facilitado la comparación inmunológica entre pacientes, permitiendo la detección de las diferencias individuales en la capacidad de responder a un antígeno, así como las diferencias del sistema inmune entre especies y edades (8); ha ayudado en la comprensión de la inmuno-supresión (6).

Existen múltiples modificaciones de la técnica, en las

que cabe mencionar la de Cunningham, donde las células linfoides y los eritrocitos, se incuban sin soporte de gel, utilizando una cámara de monocapa; es útil en estudios que implican micromanipulación de las células vivas bajo microscopía de luz, para no distorsionarlas (1).

Nossal desarrolló una modificación utilizando carboximetilcelulosa, que brinda excelentes condiciones ópticas y una monocapa muy delgada que favorece la detección de pequeñas placas de lisis (7). La carboximetilcelulosa favorece la acumulación local de proteínas alrededor de la célula secretora, por su viscosidad y por la unión reversible de proteínas. Es un cultivo abierto que permite el intercambio de gases con la atmósfera (7).

Fundamento: Las células linfoideas provenientes de un animal inmunizado con eritrocitos de carnero, se mezclan con los eritrocitos de carnero en un soporte semisólido de agarosa, donde son inmovilizadas. Al cabo de 45 minutos de incubación, los anticuerpos específicos producidos se unen a los eritrocitos de carnero y al agregar complemento, se presenta una lisis de los eritrocitos, observándose macroscópicamente la formación de pequeñas placas líticas, en cuyo centro se encuentran las células linfoideas productoras de anticuerpo.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Agar noble.

Agarosa.

Heparina.

Solución de Hank.

Solución salina isotónica.

Suero de cobayo fresco.

Eritrocitos de burro o carnero.

Amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2

Material biológico:

1 ratón inmune.

1 ratón control.

Material:

1 gradilla excavada de plástico para portaobjetos.

1 jeringa de 1 ml. con aguja del número 27.

2 tubos de centrifuga graduados estériles.

3 pipetas Pasteur.

4 pipetas de 10 ml.

3 pipetas de 1 ml.

3 pipetas de 0.2 ml.

1 caja de Petri.

4 tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

4 tubos de ensaye de 12 x 75 mm.

1 matraz Erlenmayer de 100 ml.

4 portaobjetos.

1 pipeta cuenta glóbulos (leucocitos).

1 hemocitómetro.

Equipo:

Equipo de disección.

Caja para gradillas.

Baño de hielo.

Centrífuga.

Microscopio.

Estufa a temperatura de 37 y 43°C.

METODOLOGIA

1. Inocular un ratón inmune, cinco días previos a la prueba, con 0.2 ml de una suspensión de eritrocitos de burro o carnero al 4%, previamente lavados. Utilizar un ratón control sin inocular.

2. Sacrificar a los ratones por decapitación y extraer el bazo.
3. Colocar cada bazo en una caja de Petri, conteniendo 6 ml de solución de Hank.
4. Disgregar los bazos con dos pinzas de punta roma.
5. Colectar la suspensión en un tubo de ensaye.
6. Dejar reposar de 3 a 5 minutos en baño de hielo.
7. Transferir el sobrenadante a otro tubo, sin tocar los grumos depositados en el fondo.
8. Centrifugar la suspensión a 1000 rpm durante 10 minutos y decantar.
9. Lavar el paquete celular dos veces en solución de Hank o amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2, centrifugando a la misma velocidad.
10. Resuspender las células en 5 ml de Hank o solución salina balanceada, y hacer diluciones 1:10 y 1:20. Contar en el hemocitómetro el número de linfocitos/ml. de cada dilución. Es conveniente determinar el número de células viables (ver paso número cuatro de la técnica de separación de linfocitos en sangre periférica).
11. Preparar una solución al 15% de eritrocitos de burro o carnero, en solución salina isotónica.
12. Preparar una suspensión de agar noble al 0.1% en solución salina isotónica y barnizar con ella los portaobjetos.
13. Preparar una suspensión de agarosa al 0.5% en solución de Hank; filtrarla y colocar 0.4 ml en tubos de ensaye de 12 x 75 mm.; mantener los tubos en estufa a temperatura de 43°C
14. Agregar a cada tubo 0.05 ml de la suspensión de eritrocitos de burro o carnero, sin sacar los tubos del baño.

15. Agregar 0.1 ml. de cada una de las diluciones (1:10 y 1:20) de la suspensión de células de bazo.
16. Mezclar bien y vaciar cada tubo sobre un portaobjetos barnizado y marcado previamente.
17. Colocar los portaobjetos en las gradillas de plástico, e incubar dentro de una estufa húmeda a 37°C durante una hora.
18. El complemento de cobayo se diluye 1:10 en solución de Hank y se ponen 6 ml. de tal solución en una gradilla excavada.
19. Invertir los portaobjetos con las células sobre la gradilla, de tal forma que queden en contacto con el complemento:
20. Incubar a 37°C durante dos horas más.
21. Contar el número de placas de lisis obtenidas, observado con el microscopio.

Resultados:

Placas	linfocitos/ ml.	linfocitos/ ml.	No. de placas	% de CFA
dil. 1:10	INMUNE			
	CONTROL			
dil. 1:20	INMUNE			
	CONTROL			

CUESTIONARIO

1. Mencione otras fuentes de complemento que pueden utilizarse en esta técnica.
2. ¿Qué efecto puede tener una incubación prolongada antes de añadir complemento, y por qué?

3. Explique los factores que originan la formación de placas falsas.
4. ¿Cómo se puede determinar la dilución óptima de anti--suero para obtener un número adecuado de placas líticas?
5. ¿Por qué se incuba la placa una hora, antes de añadir complemento?
6. ¿Cuál es el objeto de añadir antiglobulina de Coombs, en la medición de una reacción secundaria (IgG)?
7. ¿Qué finalidad tiene el gel, y por qué hay modificaciones en las que ha sido sustituido o eliminado?
8. ¿Cómo pueden fijarse las placas con CFA, para estudios posteriores?
9. ¿Qué rango de CFA es conveniente tener, y cómo puede ser expresado el número de las mismas?
10. Describa la técnica de recuperación de las CFA.

DISCUSION

Esta técnica para la determinación de células formadoras de anticuerpos, tiene la gran ventaja de monitorizar la respuesta inmune en forma sensitiva y cuantitativa; evalúa directamente la respuesta humoral desde su inicio; es una técnica muy sencilla y costeables, y requiere la inversión de poco tiempo para examinar grandes poblaciones celulares.

Existen múltiples modificaciones de la técnica original de Jerne, que han proporcionado una enorme versatilidad para su aplicación en un amplio campo de la inmunología. Debe tenerse cuidado en la estandarización de reactivos y poblaciones celulares, así como en el tiempo requerido de incubación, para evitar problemas tales como la obtención de placas falsas, placas pequeñas y otros.

Es recomendable determinar el número de células viables para obtener datos cuantitativos más precisos.

BIBLIOGRAFIA

1. Cunningham A. J. A Method of Increased Sensitivity for Detecting Single Antibody Forming Cells. *Nature*, 207: 1106, 1965.
2. Jerne N. K. y Nordin A. A. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science*. 140:405, - 1963.
3. Jerne N. K. y Nordin A. A. The agar plaque technique for recognizing antibody producing cells. 1a. edición. - U.S.A. Ed. Wistar Institute Press. 1963.
4. Jerne N. K., Nordin A. A., Henry C., Fuji H. y Koros. *Methods in Immunology and Immunochemistry*. 5a. edición. U.S.A. Ed. Williams & Chase, Academic Press. 1971.
5. Lefkowitz I. y Cosenza H. *Immunological Methods*. 1a. edición. U.S.A. Ed. Academic Press Inc. 1979.
6. Mitchel G. F. y Miller V. F. A. Cell to cell interaction in the immune response. Hemolysin forming cells in neonatally thymectomized mice, reconstituted with thymus or thoracic duct lymphocytes. *J. Exp. Med.*, 128:801, 1968.
7. Nossal G. J. V., Bussard A. E., Lewis H. y Mazie J. In vitro stimulation of antibody formation by peritoneal cells. Plaque technique of high sensitivity enabling access to the cells. *J. Exp. Med.*, 131:894, 1970.
8. Rijkers G. T., Frederix W. y Van Muiswinkel W. B. The haemolytic plaque assay in Carp (*Cyprinus carpio*). *J. Immunol. Methods*, 33:79, 1980.
9. Sell S. Park A. B. y Nordin A. A. Immunoglobulin classes of antibody forming cells in mice. *J. Immunology*, 104:483, - 1970.

INTERACCION ANTIGENO-ANTICUERPO.

La característica más notable de la interacción antígeno-anticuerpo, es su especialidad. Como ejemplo, tenemos el caso del anticuerpo contra la albúmina sérica de conejo, que reacciona intensamente con la albúmina de conejo, pero es inerte frente a la albúmina de otras especies.

Los estudios experimentales de Landstainer, con antígenos artificiales, mostraron que la especificidad de la reacción desde el punto de vista fisicoquímico, depende principalmente de la presencia de cadenas laterales semejantes sobre las moléculas de antígenos y de anticuerpos. Se cree que las cadenas laterales presentan una disposición espacial de tal naturaleza, que da lugar a coincidencia física cuando se acercan una a otra.

La aglutinación es la reacción más sencilla para demostrar la interacción antígeno-anticuerpo. Esta reacción entre el antígeno y el anticuerpo, forma agregados de proteína bastante grandes que pueden percibirse a simple vista. Los anticuerpos que pueden demostrarse por las técnicas de aglutinación se denominan aglutininas, y los antígenos correspondientes, aglutinógenos. La precipitación es un proceso semejante a la aglutinación, donde los anticuerpos correspondientes se denominan precipitinas. El resultado de la reacción antígeno-anticuerpo en este caso, consiste en la aparición de un precipitado granular fino, que tiende a permanecer suspendido en la solución.

La precipitación, y en menor grado la aglutinación, pueden presentar el fenómeno de prozona, que suele deberse a un exceso de antígeno, aunque menos frecuentemente pueden obedecer también a un exceso de anticuerpo.

CONTRAINMUNOLECTROFORESIS. INVESTIGACION DE ANTI
CUERPOS FRENTE A ENTAMOEBA HISTOLYTICA

Objetivo: Realizar la técnica de CIEF para demostrar la presencia de anticuerpos contra Entamoeba histolytica en suero. Analizar el fundamento de este método, evaluar la sensibilidad y especificidad que presenta para la detección de anticuerpos, y determinar las limitaciones del mismo, reconociendo las fuentes de error que pueden afectar los resultados.

Analizar el problema de salud que representa la amibiasis humana, y la utilidad de las pruebas serológicas en la epidemiología y diagnóstico de la amibiasis invasiva.

Generalidades: El patógeno amibiano prevalente en el hombre es Entamoeba histolytica, que tiene distribución mundial, encontrándose en todas las latitudes y afectando aproximadamente el 10% de la población total, llegando algunas veces hasta un 80% en regiones tropicales, dependiendo esto, principalmente de factores higiénicos (4).

En la República Mexicana la amibiasis tiene carácter endémico, sin tener relación alguna con el clima; existe un 27% de población infectada, entre la cual una gran proporción esta constituida por portadores sanos y sólo una minoría enferma como consecuencia de la invasión tisular por el parásito. La mayoría de estudios sobre la frecuencia de la amibiasis, se han realizado investigando la presencia de quistes de E. histolytica en heces, condición que no da evidencia de amibiasis invasora (1). La amibiasis es una de las principales causas de muerte en el país, y la enfermedad parasitaria más importante (2).

Los estudios realizados sobre la Inmunología de la amibiasis comprenden los aspectos siguientes: 1) Inmunidad humoral; 2) Inmunidad celular; 3) Inducción de Inmunidad experimental y 4) Inmunización humana postinfección.

E. histolytica provoca la formación de anticuerpos específicos, serológicamente detectables cuando invade los te
jidos humanos o animales (5).

En la década de los 60's, gracias a los cultivos axéni
cos de *E. histolytica* (Diamond), se desarrollaron varias
técnicas serológicas, entre las cuales, caben mencionarse la
inmunofluorescencia, la fijación de complemento, los geles
de difusión, la aglutinación de partículas de látex, la he-
maglutinación indirecta y la contrainmuoelectroforesis (6).
Estas dos últimas son las pruebas más específicas y muestran
una gran similitud de resultados, excediendo el 90% de reac-
ciones positivas, aunque la hemaglutinación indirecta es la
prueba más sensible (6). Hemos adpatado finalmente la contra-
inmuoelectroforesis, por la mayor rapidez y facilidad en su
ejecución y la cual depende de IgG, donde se encuentran prin-
cipalmente estos anticuerpos, aunque se localizan también en
IgM, que interviene en la reacción de hemaglutinación, indi-
recta (7). La IgA aparece también la amibiasis invasiva, pe-
ro aún no se conoce su papel en la reacción inmunitaria.

La serología de la amibiasis a llegado al punto de que
debe ser usada rutinariamente para la detección de anticuer-
pos específicos en pacientes sospechosos de invasión amibia-
na, así como para las encuestas epidemiológicas (2).

La contrainmuoelectroforesis es una técnica inmunológi-
ca de difusión en gel, similar a la doble difusión, según el
método de Ouchterlony. El antígeno y el anticuerpo se colo-
can en pozos diferentes, en el medio de gel de agar con amor-
tiguador, sometándose simultáneamente a la acción de un cam-
po eléctrico y en los puntos donde se unen al difundir, se
forman inmunoprecipitados (3).

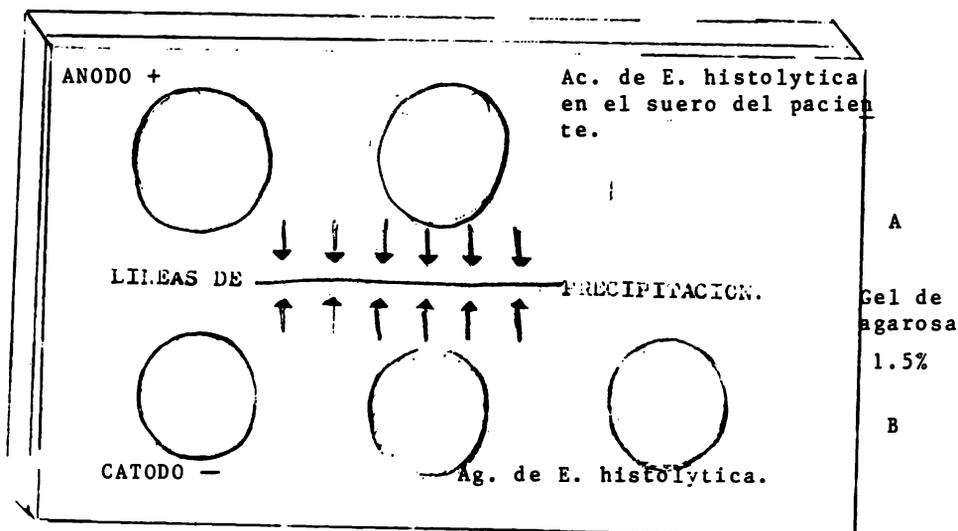
Los antígenos proteícos se mueven hacia el ánodo en el
campo eléctrico, y los anticuerpos específicos se mueven ha-
cia el catodo, debido al fenómeno electroendosmótico; cuando

los dos se unen, se forman una o varias líneas de precipitación visibles en el medio de soporte (agarosa, gel de agar). En comparación con el método de Ouchterlony, la contraelectroforesis se caracteriza por una mayor rapidez en la formación de los precipitados (45-60 minutos), y por su mayor grado de sensibilidad (concentra a todos los componentes inmunológicos en un solo lugar) (3). Obviamente, este método no es útil para antígenos con carga positiva o neutra.

La contraelectroforesis es adecuada para la determinación cuali y semicuantitativa, de los antígenos proteícos presentes en el plasma o en otros fluidos del organismo en ciertos padecimientos, cuando su movilidad electroforética es contraria a la movilidad de los anticuerpos.

Esta técnica es muy empleada pero la investigación del antígeno asociado a la hepatitis (antígeno Australia) y de los anticuerpos frente a este antígeno, para la investigación de los productos de la degradación del fibrinógeno (D y E), así como para la investigación de la α -fetoproteína y anticuerpos frente a E. histolytica (7).

REACCION ANTIGENO-ANTICUERPO EN LA PLACA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS



Fundamento: En un soporte de agarosa, se coloca el suero de prueba que contiene anticuerpos frente a *E. histolytica* en el ~~estado~~^{anodo}, y el antígeno de *E. histolytica* en el ~~estado~~^{cátodo}. Tras realizar el corrimiento electroforético adecuado con un amortiguador conveniente, por el fenómeno de electroosmoforesis, el antígeno y el anticuerpo difunden con sentido opuesto uno del otro en el gel, hasta que se unen y forman una línea de precipitación visible, resultado de la reacción antígeno-anti cuerpo.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Antígeno de *E. histolytica* para contrainmunolectroforesis, aislado de trofozoitos obtenidos en cultivo axénico (*E. histolytica* cepa HK-9). El antígeno liofilizado después de rehidratado, contiene 1 mg/ml de antígeno amibiano específico, y como conservador se debe agregar 1 mg/ml de azida de sodio.

Suero control positivo de *E. histolytica*, obtenido de cabras inmunizadas con antígeno purificado de *E. histolytica*, con 1 mg/ml de azida de sodio como conservador. Se presenta liofilizado.

Amortiguador de dietilbarbiturato-acetato con un pH de 8.2 y una fuerza iónica $M = 0.05$.

a) Para la cámara de electroforesis (amortiguador concentrado):

13.38 g de barbital sódico (5.5-dietilbarbiturato de sodio), 8.83 g de acetato de sodio trihidratado, llevar a 1.5 l con agua destilada y añadir HCl 0.1 N hasta tener un pH de 8.2 (aproximadamente 180 ml). La fuerza iónica de este amortiguador es 0.1; para su empleo diluir este amortiguador con-

centrado con agua destilada en la proporción 1:2.

b) Para la preparación del gel de agarosa:

Mediante la dilución del amortiguador concentrado en la preparación 1:10 de agua destilada, se llega a la fuerza iónica de 0.01. Como conservador añadir 0.1 ml de solución al 10% de timerosal de sodio, a 100 ml de la solución de agarosa.

1.5 g de agarosa.

Material:

Aplicadores de madera.

Pipetas capilares.

1 pipeta de 10 ml.

1 tubo de ensaye de 16 x 150 mm.

1 horador de 4 mm de diámetro.

1 plantilla.

2 placas de vidrio.

Tiras de papel filtro.

Equipo:

Cámara de electroforesis. De preferencia con sistema de enfriamiento.

Mesa horizontal.

Baño a temperatura de 90-100°C.

METODOLOGIA

1. Para preparar las placas de gel de agar, se mezclan 1.5 g de agarosa y 100 ml de amortiguador y se calientan hasta ebullición en baño de agua. Una vez que la solución está completamente clara, se deja enfriar a 80°C aproximadamente y se vacía el líquido caliente sobre las placas de vidrio que deben estar colocadas en una superficie perfectamente horizontal. La maniobra se hace mediante una pipeta precalentada, o bien, vaciando directamente desde un tubo de ensaye que con

tenga la cantidad ya medida. Para tener las placas de vidrio perfectamente niveladas, se utiliza una mesa horizontal ajustable.

Tamaño de la placa	Volumen del gel
10.0 X 10.0 cm.	20.0 ml.
20.5 X 11.0 cm.	40.0 ml.

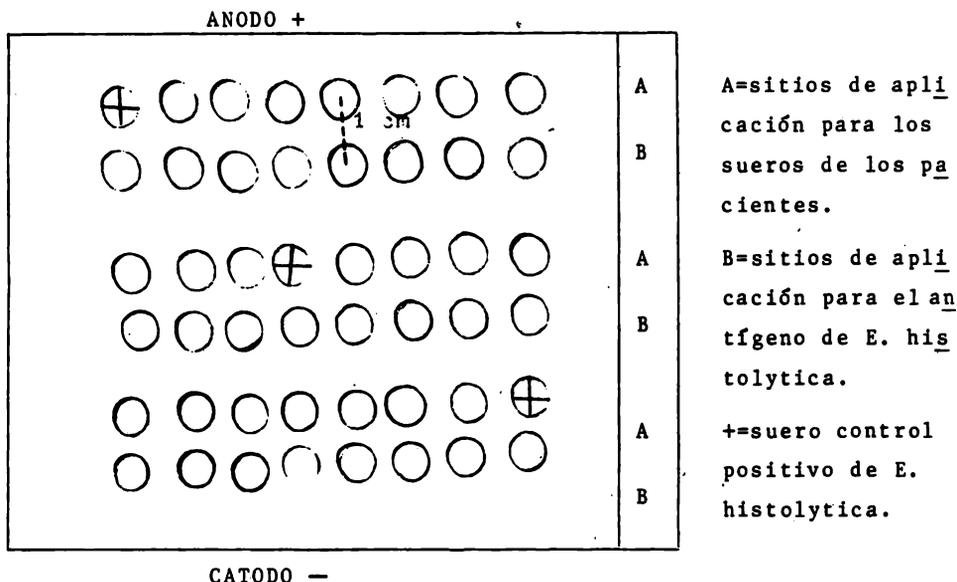
En la capa de gel solidificado por enfriamiento, horadar 3 filas dobles de pozos, con una distancia aproximada 1.5 cm entre ellas, con 6-8 pozos cada una; la distancia entre los centros de los pozos pares debe ser de 1.0 cm. Esto se puede hacer con el horador de 4 mm y guiándose por la plantilla. Retirar con cuidado el gel de agar de los cortes.

2. El antígeno de *E. histolytica* se tiene que rehidratar antes de su uso, en el volumen de agua destilada indicado en la etiqueta. Si se conserva en refrigeración, es estable durante una semana.

3. El suero control positivo de *E. histolytica*, se rehidrata en el volumen de agua destilada que viene indicado en la etiqueta. Si este suero rehidratado se conserva entre +4 y -- +6°C, puede utilizarse hasta por 14 días.

4. Los pozos de las filas A (ánodo), se llenan hasta su borde con el suero control o con los sueros problemas. En los pozos de las filas B (cátodo), se coloca el antígeno (ver el esquema siguiente):

PLACA DE CONTRAINMUNOELECTROFORESIS



5. Condiciones de la electroforesis:

- a) Amortiguador para la electroforesis: dietilbarbiturato, pH 8.2, $M = 0.05$.
- b) Voltaje: 130-160 V.
- c) Potencial: 4.5 V/cm.
- d) Intensidad por cámaras: 30 mA para la placa de 10 X 10 cm, y 60 mA para la placa de 20.5 X 11 cm.

El contacto entre el amortiguador de la cámara y la placa de gel de agar se establece mediante tiras de papel filtro de 1 mm de grueso. Si el voltaje se ajusta (cerca de 130-160 V), de tal manera que el potencial en el gel sea de 4-5 V/cm, por ejemplo. La electroforesis se lleva a cabo empleando de preferencia el sistema de enfriamiento con agua durante 45 minutos.

Resultados:

En los casos positivos, al término de la electroforesis se forman una o más líneas de precipitación, en la zona comprendida entre los pozos en que se colocaron el antígeno y el suero del paciente. Estas líneas deben aparecer siempre con el suero control positivo de *E. histolytica*. Los precipitados débiles deben intensificarse mediante tinción con algún colorante para proteínas.

ANTICUERPOS FRENTE A *E. HISTOLYTICA*: _____

Fuentes de error:

Las posibilidades de error más frecuentes se enumeran a continuación:

1. Formación de precipitados poco definidos por condensación de agua en la superficie del gel.

Causas posibles: Diferencias notables de temperatura entre la placa de gel y la cámara de electroforesis (temperatura ambiente), y alto grado de humedad.

Corrección: Dejar la cubierta de la cámara ligeramente floja, e inclusive dejar una pequeña salida para el aire.

2. Los precipitados no se forman paralelamente con dirección a la corriente.

Causas posibles:

- a) Contacto deficiente entre el papel filtro y la superficie del gel.
- b) Grosor irregular de la placa del gel de agar (posiblemente debido a sobrecalentamiento).
- c) Colocación oblicua de las placas.
- d) Colocación del papel filtro muy adentro, en la superficie del gel.

3. No hay formación de precipitados.

Causas posibles:

- a) No se colocó, o se colocaron en sitio equivocado, ya sea el antígeno o los sueros, al efectuar el llenado de los pozos.
- b) Exceso de antígeno o de anticuerpo.
- c) Se equivocaron los polos.
- d) Contacto deficiente entre los puentes de papel y la superficie del gel de agar (cuando no hay paso de la corriente, se observan anillos de difusión).

4. Excesiva agua de condensación en la parte inferior de la tapa de la cámara de electroforesis.

El agua de condensación se forma por la evaporación del agua contenida en la capa del gel durante la electroforesis, debido al sobrecalentamiento.

Causas posibles:

- a) Corriente muy alta.
- b) El agua que se utilizó para la preparación del amortiguador no fue pura, debe verificarse el pH y la conductividad.
- c) Enfriamiento insuficiente.

CUESTIONARIO

1. ¿Cómo puede obtenerse el antígeno de *E. histolytica*?
2. ¿Por qué deben nivelarse perfectamente las placas del gel de agar?
3. ¿Qué es el fenómeno electroosmótico?
4. ¿Por qué un exceso de antígeno o anticuerpo, no permite la formación de precipitado?
5. ¿Qué características deben tener los antígenos y anticuerpos usados en esta técnica?

6. ¿Cuál es la utilidad de esta prueba en la seroepidemiología?

7. Explique el fundamento de alguna otra técnica empleada para determinar anticuerpos frente a E. histolytica.

8. ¿Qué desventajas presenta la contrainmunoelectroforesis?

9. ¿Existe algún equipo comercial para realizar esta prueba?

10. Mencione algunas enfermedades parasitarias, en las cuales se utiliza como ayuda diagnóstica, la intradermoreacción, la reacción de floculación en látex, la hemaglutinación, la fijación de complemento y la inmunofluorescencia.

Discusión:

La contrainmunoelectroforesis en la investigación de anticuerpos frente a E. histolytica, es una técnica de las más sensibles y específicas, presentando además las ventajas de rapidez y facilidad en su ejecución. Se obtienen resultados cualitativos o semicuantitativos, requiriéndose en este caso en particular, conocer solamente si existen o no, anticuerpos presentes en el suero humano.

Los reactivos deben estar preparados de acuerdo a las especificaciones, pues son costosos. El equipo requerido no es sofisticado, pero debe tener un funcionamiento perfecto, pues de lo contrario todo el trabajo resulta inútil. Conociendo la variedad de fuentes de error que pueden ocurrir, es posible evitarlas.

Es fundamental no tener excesos de antígeno ni de anticuerpo, requiriéndose repetir la técnica con diluciones apropiadas, si se presenta el caso.

BIBLIOGRAFIA

1. Biagi F. Enfermedades Parasitarias. 2a. edición. México. Ed. La Prensa Médica Mexicana. 1980
2. Gutiérrez T.G. y Aubanel M. Encuesta Serológica en Niños de la Ciudad de México. VII.- Investigación de Anticuerpos contra *E. histolytica*. Arch. Invest. Méd., 3(2):371, 1971
3. Krupp I. M. Comparison of Counterimmunoelectrophoresis with other serologic tests in the Diagnosis of Amebiasis. Am. J. Trop. Med. Hyg., 23:27, 1974
4. Reporte de WHO Expert Committee. Amebiasis. World Health Organization Technical Report, 421, 1969.
5. Peacock E. J. y Tomar H. R. Manual of Laboratory Immunology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger: 1980.
6. Sepúlveda B. Inmunología de la Amibiasis. Presentada en el Simposio Internacional sobre Tópicos selectos de Inmunología, organizado por el Instituto de Estudios Biomédicos de la U.N.A.M., 1979.
7. Sepúlveda B., Aubanel M., Landa y Velázquez G. Avances en la Técnica de Contraimmunoelectroforesis para el estudio Serológico de la Amibiasis. Arch. Invest. Med., 3(2):363, - 1972.
8. Sodeman W.A. y Dowdo M.C. Rapid Serological Methods for the Demonstration of *E. histolytica* Activity. Gastroenterology, 65(4): 604; 1973.

ELECTROINMUNODIFUSION. CUANTIFICACION
DE SEROALBUMINA HUMANA

Objetivo: Utilizar el método de electroinmunodifusión para cuantificar la seroalbúmina humana. Analizar el fundamento de este método y distinguir las ventajas que proporciona su empleo en comparación con la inmunolectroforesis y la inmunodifusión radial. Determinar y considerar las posibles fuentes de error en el desarrollo de la práctica, evaluando las ventajas y desventajas del método. Señalar las posibles aplicaciones de esta técnica.

Generalidades: La electroinmunodifusión (EID) es un método para cuantificar proteínas, desarrollado por Laurell y por Merrill simultáneamente en 1966 (2,3), donde se combinan el rápido análisis inmunolectroforético y la especificidad de la inmunodifusión radial, para obtener resultados más precisos en un tiempo menor (4-5 horas, comparado con días) (4).

En esta técnica de EID, el antígeno se desplaza mediante electroforesis hacia un soporte, en este caso gel de agarosa, que contiene el anticuerpo monovalente. La versatilidad del método, ha permitido, realizar ciertas modificaciones, para superar algunos problemas técnicos que se presentan; se utilizan varios tipos de soportes, entre los cuales los más empleados son los geles de agarosa con amortiguadores adecuados para cada proteína, o bien tiras de acetato de celulosa básicamente (7). Como condición de la prueba, los anticuerpos no deben migrar en el gel durante la electroforesis y los antígenos deben presentar movilidad electroforética; por tal motivo se han desarrollado procedimientos que permiten modificar químicamente el anticuerpo o el antígeno, para alterar sus movilidades electroforéticas y tener así las condiciones adecuadas para el corrimiento. En

tre estos procedimientos, cabe mencionar la carbamilación del anticuerpo y la copolimerización de los antígenos con glutaraldehído (1).

Dependiendo de su movilidad electroforética, la proteína a cuantificar, se coloca unas veces en el ánodo y otras en el cátodo (8). Al difundirse el antígeno en el material de soporte que contiene el anticuerpo, se van formando dos líneas de precipitación que se unen en el punto de equivalencia entre el antígeno y el anticuerpo, dando así imágenes de "cohetes" (3)

Cuando las moléculas de antígeno migran, se presenta inicialmente un exceso de antígeno, y los pequeños complejos solubles formados con moléculas de antígeno, siguen migrando a menor velocidad en el gel que contiene anticuerpo. Continuando la electroforesis se alcanza la condición en la cual, el tamaño del complejo antígeno anticuerpo, causa precipitación. El precipitado no se mueve y es rebasado por antígeno no unido a pequeños complejos, hasta que este último, o el anticuerpo son consumidos. En este punto se forma el "cohetes" que no se mueve aunque continúe la electroforesis, encontrándose aquí el punto de equivalencia (2). El tiempo requerido para el corrimiento electroforético varía entre 10 y 60 minutos; la intensidad de corriente que debe aplicarse, varía entre 3 y 6 miliamperes por centímetro (mA/cm) (5).

Es conveniente correr de 3 a 5 soluciones de concentraciones conocidas a la vez, y cuyos resultados servirán para trazar una curva de calibración (8).

La distancia medida en milímetros entre el pozo donde se colocó el antígeno y la punta del "cohetes", es directamente proporcional a la concentración del antígeno. A partir de la curva de calibración, mediante extrapolación y mul

tiplicando por el factor de dilución de la muestra, se obtienen finalmente los valores de la concentración de proteína en mg/100 ml de suero problema (4).

Si las bandas de precipitación son muy tenues, o se desea fotografiar las placas, y siempre que se usen tiras de acetato de celulosa, se procederá a lavar para eliminar las proteínas que no reaccionaron, y a teñir con cualquier colorante para proteínas, entre los cuales se tienen el negro de amida, el rojo de Ponceau, el azul de bromofenol, la fucsina ácida, la azocarmina, y la nigrosina, que son los más comunmente usados (7).

Este método por su versatilidad, ha utilizado mucho para la cuantificación en suero, plasma, líquido cefalorraquídeo y orina, de prealbúmina, albúmina, α_1 glicoproteína ácida, α_1 antitripsina, α_1 antiquimiotripsina, inhibidor de intertripsina, ceruloplasmina, haptoglobina, C_{3a} , C_4 , transferrina, hemopexina, proteína C reactiva, inactivador de C_{1s} , IgG, IgA, IgM, IgD, IgE, antígeno asociado al factor de la coagulación VIII, y otras (5).

La seroalbúmina humana, pequeña proteína con un peso molecular de 69 000 daltons, que tiene como función principal en el plasma, conservar la presión osmótica de la sangre, se puede cuantificar por electroinmunodifusión.

Fundamento: La seroalbúmina humana se difunde en un gel de agarosa que contiene anticuerpo anti-albúmina humana, tras realizar un corrimiento electroforético, produciéndose una precipitación por la reacción antígeno-anticuerpo con imagen de "cohete" al alcanzarse el punto de equivalencia. Al comparar la longitud alcanzada por la imagen que produce la muestra, con las longitudes alcanzadas por las imágenes producidas por soluciones patrón corridas simultáneamente, es posible determinar la concentración de albúmina en la muestra problema.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Amortiguador de fosfatos con pH de 7.4, 0.15 M.

Agarosa (Agar purum).

Suero problema.

Suero anti-albúmina humana.

Suero normal estandarizado.

Medio: agarosa al 1.5% en amortiguador de fosfatos, agregando algunos cristales de fenol.

Material:

2 placas de vidrio de 6 x 8 cm.

1 molde o plantilla: se diseñará sobre papel milimétrico, 8 pozos de 2.5 mm de diámetro, a una distancia de 4 mm uno de otro.

Mechas de papel para electroforesis.

1 jeringa para aplicación Hamilton de un microlitro, con punta de teflón.

1 capilar de vidrio de 2.5 mm de diámetro.

1 pipeta de 1 ml.

1 pipeta de 10 ml.

1 regla milimétrica.

Equipo:

Cámara de electroforesis.

Fuente de poder de corriente estabilizada que mantendrá una potencia de 6 mA, con un voltaje de 100-200 volts.

Agitador magnético.

Baño a temperatura de 45-55°C.

METODOLOGIA

1. Colocar 19 ml de agarosa al 1.5% (en amortiguador de fosfatos) en baño de agua de 45-55°C, así como una pipeta de 1.0 ml.
2. Utilizando agitación magnética, agregar un ml de suero antialbúmina humana, previamente calentado en baño de agua a 45-55°C (para tener la proporción de 1:20), así como algunos cristales de fenol como conservador. Mantener la agitación y la temperatura indicada, a modo de que queden perfectamente mezclados.
3. Mediante una pipeta de 10 ml igualmente calentada, vaciar rápidamente 7.5 ml de la mezcla anterior en el centro de cada placa de vidrio, previamente nivelada y sellada - con agarosa. (Es muy importante el perfecto control de 45-55°C, así como la rapidez con que debe trabajarse en este paso). La temperatura puede ocasionar la desnaturalización del suero, o la solidificación prematura de la agarosa.
4. Cuando ya ha endurecido la placa de agarosa, cortar - los 8 pozos de 3 mm de diámetro, utilizando la plantilla hecha sobre papel milimétrico, y el tubo capilar. Medir en 4 pozos el suero estándar en diluciones: 1:64, 1:128, 1:256 y 1:512. Los 4 pozos restantes se llenan con los sueros problema.
5. La intensidad de la corriente eléctrica se ajusta apli cando 6 mA por cada placa con las medidas especificadas en esta técnica, o bien 1 mA/cm. lineal, según el ancho de la placa o placas colocadas dentro de la cámara de electroforesis.
6. La albúmina corre del polo negativo al polo positivo;

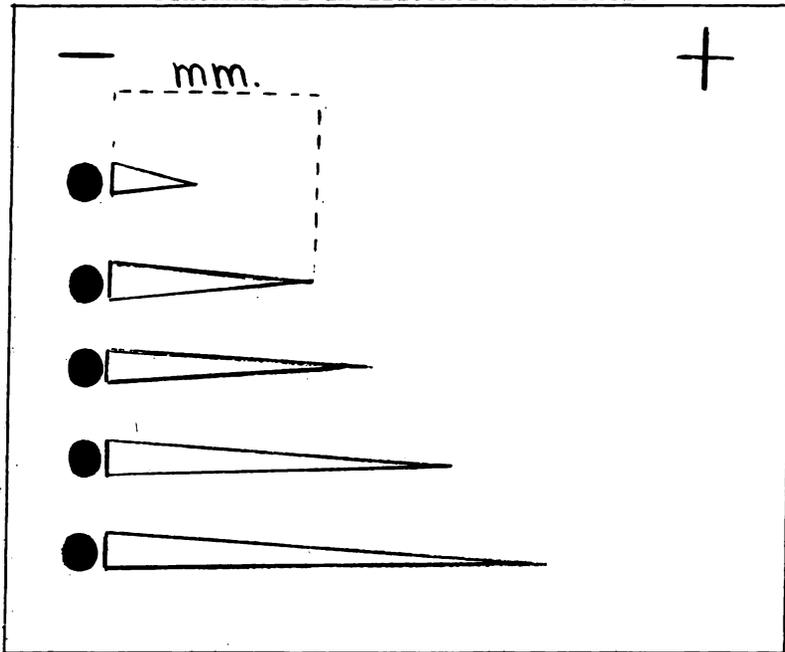
por consiguiente, los pozos cargados deben colocarse del lado del cátodo. El corrimiento se efectúa durante 10-20 minutos aproximadamente.

Resultados:

Las longitudes de las áreas de precipitación, se miden con una regla milimétrica. Se traza una curva patrón en papel milimétrico a partir de los datos obtenidos con las soluciones de concentraciones conocidas, graficando en la línea de las abscisas las concentraciones de los sueros estándar, y en las ordenadas la longitud (en mm) de los "cohetes".

Interpolar los valores obtenidos por los problemas.

DIAGRAMA DE LA ELECTROINMUNODIFUSION



Concentración del problema = _____ mg/100 ml de sero-
albúmina.

Fuentes de error:

1. Aplicación incorrecta de la muestra, por poner volúmenes incorrectos de muestra, por derrame fuera de los pozos de la misma, o bien por ruptura de los pozos que puede originar la formación de "cohetes" secundarios.
2. Por un largo periodo entre la aplicación de las muestras y el inicio de la electroforesis, se pueden obtener pequeños "cohetes" de base ancha.
3. Al pasar mucha corriente, o por un enfriamiento insuficiente durante la electroforesis, se puede producir secado o distorsión del soporte de agarosa.
4. Cambios en el pH de la solución amortiguadora.
5. Un mal contacto entre la agarosa y las mechas de papel, que causa una precipitación en ondas.
6. No alinear los soportes adecuadamente en la cámara de electroforesis, produce "cohetes" torcidos.
7. El desnivel en el soporte de agarosa, da como resultado diferencia en el grosor, y por lo tanto se obtienen datos inconsistentes.
8. Un tiempo de electroforesis muy corto produce "cohetes" sin punta.
9. Diluciones incorrectas.
10. Un enfriamiento diferente entre la superficie superior e inferior del soporte de agar, origina mayor movimiento del antígeno cerca de una superficie que de la otra.
11. Evaporación y secado de los soportes durante el almacenamiento.

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué corre la albúmina en un pH de 7.4, del cátodo al ánodo?

2. ¿Cuál es la importancia del amortiguador, que propiedades debe tener y por qué?
3. Explique un método que permita modificar el movimiento electroforético del antígeno o el anticuerpo.
4. ¿Cuál es el objeto de tener un estricto control de la temperatura en la preparación del gel usado en la electroinmunodifusión?
5. ¿Por qué debe tenerse mucho cuidado con la corriente eléctrica en esta práctica?
6. ¿Cómo es posible determinar la dilución apropiada del antisuero?
7. ¿Qué debe hacerse en caso de que los "cohetes" resulten muy pequeños para poderlos medir exactamente, o cuando no presenten picos?
8. ¿Qué ventajas presenta la electroinmunodifusión sobre la inmunodifusión radial?
9. Explique la microtécnica diseñada para realizar la electroinmunodifusión y las ventajas que presenta.
10. Señale otras dos aplicaciones de la técnica de electroinmunodifusión.

DISCUSION

La electroinmunodifusión es una técnica útil para cuantificar un gran número de proteínas, que tiene la ventaja de ser una prueba de rápida ejecución, que proporciona resultados en un tiempo corto (4-5 horas), en comparación con la inmunodifusión radial que requiere varios días para que difunda el antígeno. Resulta más precisa que la inmunodifusión radial, porque es más fácil medir exactamente la longitud de un "cohetes", que el área de un círculo.

Los reactivos empleados son económicos, requiriéndose cantidades muy pequeñas de antígeno (0.5-2.0 mg), e inclusive existen microtécnicas con soportes comerciales.

La técnica proporciona versatilidad, que se ha incrementado por el desarrollo de métodos químicos, que permiten alterar el movimiento electroforético tanto del antígeno como del anticuerpo. El equipo que se utiliza es de fácil acceso en un laboratorio y debe estar en perfectas condiciones para combatir las posibles fuentes de error. La electroinmunodifusión es de gran utilidad para realizar análisis seriados.

En esta prueba, deben estandarizarse y controlarse minuciosamente las variables, como son la corriente, el tiempo de corrimiento y la temperatura. Es requisito indispensable, conocer la movilidad electroforética de la proteína que se va a cuantificar y es obligatorio usar siempre en estas determinaciones, un antígeno patrón.

Cualquier descuido en la preparación de los reactivos, de la placa o el corrimiento, origina resultados falsos.

BIBLIOGRAFIA

1. Bjerrum O. J., Ingild A., Lowenstein H. y Weeke B. - Quantitation of human IgG by rocket immunoelectrophoresis at pH 5 by use of carbamylated antibodies: a routine laboratory method. Clin. Chim. Acta, 46:337, 1970.
2. Laurell C. B. Quantitative Estimation of Proteins by Electrophoresis in Agarose Gel Containing Antibodies. Anal. Biochem., 15:45, 1966.
3. Merrill D. A., Hartley I. F. y Claman H. N. Electroimmunodiffusion (E.I.D.). A simple, rapid method for Quantitation of Immunoglobulins in dilute Biological Fluids. Lab. Clin. Med., 69:151, 1967.

4. Rose R. N. y Bigazzi E. P. *Methods in Immunodiagnosis*. 1a. edición. U.S.A. Ed. John Wiley & Sons. 1978.
5. Rose R. N. y Friedman H. *Manual of Clinical Immunology*. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.
6. Salvaggio J. E., Arquembourg P. C. y Gardnel, A. S. A Comparison of Electroimmunodiffusion and Single Radial Diffusion Quantitation of Immunoglobulins in a dilute solution. *J. Allerg.*, 46:326, 1970.
7. Verbruggen R. Quantitative Immuno-electrophoretic Methods: A Literature Survey. *Clin. Chem.*, 21:5, 1975.
8. Weir D. M. *Handbook of Experimental Immunology*. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1978.

HEMAGLUTINACION INDIRECTA. TITULACION DE ANTI
CUERPOS FRENTE A TIROGLOBULINA

Objetivo: Definir el fundamento del método de hemaglutinación indirecta, con previo tñado de eritrocitos, y reconocer la versatilidad que proporciona el mismo en la investigación de anticuerpos. Demostrar la presencia de anticuerpos frente a tiroglobulina en suero, interpretar los resultados, valorar las limitaciones, y evaluar la utilidad de la técnica de hemaglutinación indirecta en comparación con otras técnicas empleadas con la misma finalidad.

Generalidades: La hemaglutinación indirecta o pasiva, consiste en la aglutinación de eritrocitos recubiertos con antígenos solubles, en presencia de anticuerpo (9). Los eritrocitos de carnero, o los humanos del tipo "0", se usan como soportes o acarreadores pasivos de los antígenos o anticuerpos, porque son fáciles de obtener y conservar en el laboratorio bajo ciertas condiciones durante 15 a 30 días (7). Los antígenos que pueden fijarse espontáneamente a su superficie, son casi todos los polisacáridos y ciertas proteínas antigénicas, absorbidos físicamente o unidos covalentemente a la membrana eritrocítica (9). Entre las proteínas que son convenientemente reactivas para la prueba de aglutinación, tenemos la tiroglobulina, el PPD, el toxoide de Clostridium tetani, la toxina de Corynebacterium diphtheriae, la albúmina humana y sérica bovina, y numerosas hormonas (8).

Boyden desarrolló la técnica de eritrocitos tratados con ácido tánico, que aumenta la cantidad de antígeno unido a la célula por atracción electrostática, confiriendo mayor sensibilidad al método y por lo cual su empleo se ha difundido ampliamente en el diagnóstico de un gran número de en-

fermedades, permitiendo cuantificar anticuerpos humorales por aglutinación. (1)

Además del ácido tánico, se han utilizado también tripsina, glutaraldehído, cloruro crómico y otros reactivos - (5,8).

La estabilidad durante el almacenamiento de las células tanadas y recubiertas con el antígeno (sensibilizadas), se logra por formalinización de la suspensión final (2).

Como algunos sueros contienen anticuerpos heterófilos capaces de aglutinar eritrocitos de carnero, se debe incluir un control de eritrocitos de carnero tanados sin sensibilizar (testigo negativo). Si existe aglutinación, la prueba se repite con el suero previamente absorbido con eritrocitos de carnero tanados (7). La prueba de hemaglutinación indirecta, puede realizarse mediante una macrotécnica en tubo, o una microtécnica en placa (7).

Las enfermedades autoinmunes, son aquellas condiciones en las cuales el daño estructural o funcional, o ambos, son producidos por reacciones humorales y reacciones mediadas por inmunidad celular, hacia los componentes normales del cuerpo.

La tiroiditis autoinmune está definida por la presencia de anticuerpos circulantes y/o, células inmunocompetentes que son capaces de reaccionar con el tejido tiroideo (6).

Las propiedades funcionales y estructurales exclusivas de la glándula tiroides, predisponen el desarrollo de la respuesta autoinmunitaria. El principal constituyente del folículo es la tiroglobulina, que es una glucoproteína con un alto P.M. de 650 000 daltons, representando la forma de almacenamiento de las hormonas tiroxina y triyodotironina, que afectan la velocidad del metabolismo en todas las células del cuerpo (4).

La incidencia de la tiroiditis autoinmune es de aproximadamente 7% de la población (3). La incidencia está grandemente aumentada en parientes cercanos de gente con enfermedad de la tiroides. Más del 80% del hipotiroidismo está relacionado con tiroiditis autoinmune (3).

La tiroglobulina puede ser extraída de la glándula tiroides humana, por las técnicas de precipitación con sales neutras y absorbida a eritrocitos de carnero tanados; proporciona un reactivo para la prueba de hemaglutinación indirecta, en la detección de anticuerpos frente a tiroglobulina. Esta técnica fue inicialmente aplicada por Witebsky y Rose en 1957 (10), para cuantificar anticuerpos contra tiroglobulina, que pueden ser también demostrados por otros procedimientos como son la precipitación en agar, la inmuno--fluorescencia indirecta, la fijación de complemento, el radioinmunoanálisis y el ELISA (8).

Las pruebas más comunmente utilizadas son la hemaglutinación pasiva y la inmunofluorescencia indirecta (8).

La hemaglutinación pasiva con eritrocitos tanados, o tratados con cloruro crómico es muy sensible (.02-.04 μ g de anticuerpo), y detecta anticuerpos frente a tiroglobulina, en una variedad de enfermedades además de las de tiroides, que es una desventaja desde el punto de vista diagnóstico (6).

La inmunofluorescencia indirecta es menos sensible, pero puede detectar anticuerpos no aglutinantes como el CA2 (8).

La hemaglutinación indirecta alcanza un 80% de resulta dos positivos en la tiroiditis de Hashimoto, y un menor porcentaje en la enfermedad de Graves (6).

Para diagnosticar la patología autoinmune de la glándula tiroides, se demuestra la presencia del autoanticuerpo principal contra tiroglobulina y en menor grado el antígeno

microsomal (3). Se pueden encontrar autoanticuerpos frente a estos constituyentes de la glándula tiroides, en: tiroiditis aguda, subaguda, fibrótica, crónica (enfermedad de Hashimoto), hipotiroidismo primario (mixedema en el adulto), hipertiroidismo (tirotoxicosis o enfermedad de Graves), y carcinoma de tiroides, haciéndose la diferenciación de estos padecimientos, de acuerdo a sus manifestaciones clínicas, el estudio histológico y otras pruebas de laboratorio (4).

Los anticuerpos frente a la tiroglobulina pueden presentarse en otro tipo de padecimientos como: anemia perniciosa, gastroenteritis atrófica, insuficiencia renal idiópática, insuficiencia paratiroidea, insuficiencia adrenal, diabetes mellitus, síndrome de Sjogren, y también se encuentran en sujetos aparentemente sanos (8). Los pacientes con tiroiditis de Hashimoto, presentan títulos de tiroglobulina desde 650 hasta varios millones (4).

Fundamento: Para cuantificar la tiroglobulina humana presente en suero, se hacen reaccionar diluciones seriadas de dicho suero, con cantidades constantes de una suspensión de eritrocitos tanados, y sensibilizados con el antígeno específico; la mayor dilución que determina una clara hemaglutinación se considera como punto final de la reacción y representa el título de anticuerpos (6).

PRIMERA PARTE

TANADO Y SENSIBILIZACION DE LOS ERITROCITOS.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL

Reactivos:

Citrato de sodio al 3.8%

Amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2, 0.15 M.

Amortiguador salino de fosfatos con pH de 6.4, 0.15 M.

Acido tánico diluido 1:20 000.

Formaldehido al 40%.

Antígeno: tiroglobulina humana purificada.

Suero normal de conejo, inactivado a 56°C durante 40 minutos, o a 63°C durante 3 minutos.

Eritrocitos de carnero.

Material:

4 tubos de ensaye de 13 x 100 mm.

3 pipetas de 5 ml (1/10).

2 pipetas de 1 ml (1/10)..

1 pipeta Pasteur.

1 gradilla.

Equipo:

Centrífuga.

Estufa a temperatura de 37°C.

Baño a temperatura de 56°C.

TANADO DE LOS ERITROCITOS

METODOLOGIA

1. Lavar 3 veces los eritrocitos suspendidos en citrato de sodio al 3.8%, con amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2, centrifugando a 2 000 rpm durante 5 minutos.
2. Medir el paquete celular y hacer una suspensión al 2.5%, agregando 4 ml de amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2, por cada 0.1 ml del paquete de eritrocitos.
3. En un tubo de ensaye, tomar 4 ml de la suspensión de eritrocitos al 2.5% (procurando homogeneizar perfectamente la suspensión).
4. Agregar un volumen igual de ácido tánico 1:20 000.

5. Incubar la mezcla en baño de agua a 37°C durante 15 minutos.
6. Centrifugar a 2 000 rpm durante 5 minutos, retirar el sobrenadante con pipeta Pasteur y resuspender en amortiguador salino de fosfato con pH de 7.2, volviendo a centrifugar 5 minutos.
7. Retirar el sobrenadante y resuspender el paquete de eritrocitos en 4 ml de amortiguador salino de fosfatos con pH de 6.4, para tener la suspensión nuevamente al 2.5%.

SENSIBILIZACION DE LOS ERITROCITOS CON ANTIGENO

1. Sensibilizar los eritrocitos tanados, agregando un volumen igual de la dilución óptima de antígeno en amortiguador salino de fosfatos con pH de 6.4: (tomar 2 ml de la suspensión de células tanadas al 2.5% y agregar 2 ml de la dilución óptima de antígeno tiroglobulina humana).
2. Guardar los otros 2 ml de células tanadas.
3. Incubar la mezcla en estufa a temperatura de 37°C. durante 15 minutos.
4. Retirar las células del baño de agua y centrifugar durante 5 minutos a 2 000 rpm.
5. Decantar el sobrenadante y lavar las células dos veces, por centrifugación a 2 000 rpm por 5 minutos con suero normal de conejo al 1%, diluido en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.
6. Ajustar el paquete de células al 1.5%, resuspendiendo en 3.3 ml de suero normal de conejo al 1%, diluido en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.
7. Los 2 ml de eritrocitos tanados sin sensibilizar, ajustarlos a una suspensión al 1.5%, en suero normal de conejo al

1%, diluido en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2 (centrifugar, retirar el sobrenadante y agregar 3.5 ml de suero normal de conejo al 1%, diluido en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2).

FORMALINIZACION DE LOS ERITROCITOS.

1. Añadir a los eritrocitos sensibilizados y sin sensibilizar, lentamente 2 ml, gota a gota, de formaldehído al 40% por cada 10 ml de suspensión (a cada uno de los tubos agregar 0.2 ml de formaldehído al 40%).
2. Dejar reposar 18 horas a 4°C.
3. Agregar otros 0.2 ml de formaldehído al 40%, a cada uno de los tubos.
4. Cuando las células han sedimentado (después de 2 o 3 días), retirar el sobrenadante y resuspender las células en su volumen original de suero normal de conejo al 1%, en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.
5. Agitar nuevamente las células, y añadir una gota (0.05 ml) de formaldehído al 4%.

DETERMINACION DE LA CONCENTRACION OPTIMA DE ANTIGENO.

1. Preparar 4 diluciones del antígeno de tiroglobulina humana en amortiguador salino de fosfatos con pH de 6.4, 1:20, 1:40, 1:80 y 1:160.
2. Sensibilizar los eritrocitos con cada dilución de antígeno, como se indicó anteriormente.
3. Probar con un suero positivo y otro negativo, cada una de las diluciones. La dilución más baja de antígeno que proporcione el título más elevado con el suero inmune y no reaccione con el suero negativo, se considerará la óptima.

SEGUNDA PARTE

DESARROLLO DE LA PRUEBA DE HEMAGLUTINACION PASIVA.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Suero control positivo.

Suero control negativo.

Suero problema.

Suero normal de conejo en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2, 0.15 M.

Eritrocitos sensibilizados con antígeno de tiroglobulina.

Material:

Equipo para microtitulación.

Pipeta de 0.025 ml.

Placas de microtitulación con fondo en "U".

Equipo:

Baño a temperatura de 56°C. o 63°C.

Rotor.

METODOLOGIA

1. Inactivar los sueros problema a 56°C durante 30 minutos, o a 63°C, 3 minutos.
2. A todas las excavaciones con fondo en "U" de la placa de microtitulación, agregar con una micropipeta 0.025 ml de suero normal de conejo al 1% diluido en amortiguador salino de fosfatos con pH de 7.2.
3. Cargar el microdilutor con 0.025 ml de suero problema y colocarlo en la primera poza; mezclar completamente y trans

ferir 0.025 ml a la poza siguiente, repitiendo este proceso hasta la última poza de la hilera donde se descarta - - 0.025 ml.

4. A cada dilución de suero, agregar con una micropipeta 0.025 ml de la suspensión de eritrocitos al 1.5% sensibilizados.

5. Colocar la placa en el rotor de 1 a 3 minutos.

6. Dejar reposar la placa a temperatura ambiente durante 2 a 3 horas, cubriéndola; hacer la lectura.

Controles Requeridos:

a) Control del diluyente:

1. Depositar 0.025 ml de suero normal de conejo al 1% en una hilera de pozas, y agregar 0.025 ml de la suspensión de células sensibilizadas al 1.5%. Esta reacción deberá ser negativa.

b) Control de Sueros:

1. Probar las mismas diluciones del suero problema, con eritrocitos sin sensibilizar.

2. Hacer las mismas diluciones del suero control positivo, y agregar 0.025 ml de eritrocitos sensibilizados a cada una de las pozas.

3. Realizar la misma operación con un suero negativo conocido.

Resultado:

Una fuerte hemaglutinación da una rueda uniforme en el fondo de la placa. Se reporta como (+). Las reacciones débiles de hemaglutinación, presentan muestras en forma de dona y se reportan como ($\frac{+}{-}$). Donde no se presenta hemaglutinación aparece un botón compacto de células en el centro de la poza, y se reporta como (-).

REPORTE

	Control Positivo	Control Negativo	Diluyente	Problema
1:4				
1:8				
1:16				
1:32				
1:64				
1:128				
1:256				
1:512				
1:1024				
1:2048				
1:4096				

La dilución más alta que presenta una clara hemaglutinación, se considera como punto final de la reacción y representa el título de anticuerpos.

Título de anticuerpos del suero problema = _____

El título de tiroglobulina en pacientes normales es - -
≤ 1:32.

CUESTIONARIO

1. Mencione otras partículas que pueden ser utilizadas como soporte en la reacción de aglutinación pasiva.
2. ¿Cuál es el objeto de calentar los sueros antes de agregar los eritrocitos?
3. ¿Cuál es la finalidad de utilizar suero de conejo en esta práctica?
4. ¿Qué son los anticuerpos heterófilos?
5. Describa la clasificación de los métodos de aglutinación existentes.

6. Esquematice la reacción de hemaglutinación indirecta.
7. ¿Qué produce la degradación proteolítica de la tiroglobulina?
8. ¿Cómo se realiza la prueba de inmunofluorescencia para determinar los anticuerpos microsomales?
9. ¿Cuál es el objeto de realizar una formalización de los eritrocitos tanados y sensibilizados?
10. Mencione otros 5 anticuerpos que se investigan para detectar patologías autoinmunes.

DISCUSION

La prueba de hemaglutinación indirecta para la determinación de tiroglobulina tiene la ventaja de ser muy sensible, pudiendo detectar cantidades tan pequeñas como son 0.02-0.04 μ g de proteína en el suero. La elaboración de la técnica es sencilla, no requiere equipo sofisticado y una vez que se tienen los eritrocitos tanados y sensibilizados ya formalizados, la prueba es muy rápida. Aplicando la microhemaglutinación se tiene la ventaja de utilizar muy poca cantidad de reactivos. La solución de antígeno para sensibilizar a los eritrocitos puede usarse repetidamente, hasta por más de 4 veces, sin afectar la sensibilización. Por ser una técnica tan versátil, se utiliza en múltiples determinaciones.

Debe tenerse mucho cuidado para controlar las reacciones no específicas, evitando contaminación bacteriana de eritrocitos y otros reactivos y realizando controles positivos, negativos y del diluyente. Si existen anticuerpos heterófilos, deben ser eliminados mediante absorción con eritrocitos, antes de la prueba.

La concentración del antígeno, el tiempo, la temperatura, el diluyente y los eritrocitos deben estandarizarse.

Puede suceder que la reproducción de resultados no se obtenga usando diferentes lotes de eritrocitos, o después del almacenamiento de las células. Esto se elimina utilizando eritrocitos frescos o formalinizados.

Una fuente de error muy importante es la que se produce por la evaporación, que se elimina cubriendo las placas.

La desventaja de utilizar esta técnica para determinar tiroglobulina, consiste en que es tan sensible que detecta anticuerpos en una variedad de condiciones además de la tiroiditis, por lo cual deben realizarse estudios clínicos para confirmar la enfermedad.

BIBLIOGRAFIA

1. Boyden S. The Adsorption of Proteins on Erythrocytes Treated with Tannic Acid and the Subsequent Hemagglutination by Anti-protein Sera. *J. Exp. Med.*, 93:107, 1957.
2. Garvey J. S., Cremer E. N. y Sussdorf H. D. *Methods in Immunology*. 3a. edición. U.S.A. Ed. W. A. Benjamin Inc. 1977.
3. Evered D. C. *Diseases of the Thyroid*. 1a. edición. Great Britain. Ed. Pitman Medical Co. 1976.
4. Gell P. G. H., Coombs R. R. A. y Lachmann P. J. *Clinical Aspects of Immunology*. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific. Pub. 1975.
5. Kofler R. y Wick G. Some Methodology of the Chromium Chloride Method for Coupling Antigens to Erythrocytes. *J. Immunol. Methods*, 16:201, 1977.
6. Peacock E. J. y Tomar H. R. *Manual of Laboratory Immunology*. 1a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger. 1980.
7. Rose R. N. y Bigazzi E.P. *Methods in Immunodiagnosis*. 1a. edición. U.S.A. Ed. John Wiley & Sons. 1973.

8. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.

9. Weir D. M. Handbook of Experimental Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1978.

10. Witbsky E. y col. Chronic Thyroiditis and autoimmunization. J. Amer. Med. Assoc., 164: 1439, 1957.

APLICACION DE DIFERENTES TECNICAS INMUNOLOGICAS COMO
AUXILIARES DIAGNOSTICOS

Desde la década pasada, la inmunología clínica se ha convertido en un ingrediente esencial de muchas áreas de la medicina clínica.

A finales del siglo pasado y principios de este siglo, muchos bacteriólogos ya ofrecían sus servicios a médicos, para proporcionar pruebas serológicas en la identificación y cuantificación de anticuerpos bacterianos en el suero de pacientes.

Durante la segunda era de oro de la inmunología, que empezó en 1960, muchos de los trabajos de serología, continúan dirigidos hacia el campo de la inmunología antimicrobiana. Se ha reconocido también que el fenómeno inmunológico, se encuentra involucrado en diversas enfermedades humanas, en rechazo de transplantes y en la progresión de tumores.

En la actualidad ya se han explotado nuevas técnicas para detectar la inmunidad de tumores, para medir con precisión las capacidades inmunológicas de pacientes con enfermedades malignas, así como de los que se sospecha padecen enfermedades autoinmunes, inmunodeficiencias congénitas o adquiridas, así como de enfermedades virales de larga duración.

FIJACION DE SUPERFICIE Y AGLUTINACION EN PLACA.
REACCIONES FEBRILES

Objetivo: Analizar el fundamento y aplicar las técnicas de fijación en superficie y de aglutinación en placa, en las reacciones febriles. Evaluar la importancia diagnóstica de las reacciones febriles. Interpretar los resultados obtenidos, valorando las ventajas y limitaciones de las técnicas.

Generalidades: La infección por microorganismos de diversas especies, conduce a una marcada elevación de la temperatura, lo cual dificulta el diagnóstico de la enfermedad (6). Tal es el caso de la fiebre tifoidea causada por *Salmonella typhi*, las paratifoideas causadas por *Salmonella paratyphi A* y *B*, la fiebre de malta causada por *Brucella melitensis* y el tifo causado por *Rickettsia prowaseki* (5). El diagnóstico etiológico de las infecciones, se realiza - por el aislamiento del patógeno en el espécimen que lo contiene y se confirma la identidad del microorganismo, empleando métodos serológicos y bioquímicos (8). Frecuentemente, el aislamiento del patógeno no es posible; en tal caso el diagnóstico etiológico se realiza, al identificar la presencia y título de anticuerpos en el suero del sujeto, que son resultados de la respuesta humoral inducida por el microorganismo (6). La aglutinación de bacterias con un antisuero específico, se efectúa por presencia en el antisuero de anticuerpos dirigidos contra el mosaico de antígenos que forman la superficie celular, la cápsula o flagelos del microorganismo (5).

Las reacciones de aglutinación se utilizan por laboratorios de investigación, para estudios básicos de la composición antigénica de las bacterias, por laboratorios clínicos en el diagnóstico de enfermedades infecciosas, así como

para seguir la evolución del proceso, en aquellos casos que eixsta una correlación entre el título de anticuerpos y el cuadro clínico, y por taxonomistas en la clasificación de bacterias (4).

Un título elevado de aglutininas bacterianas, refleja una respuesta secundaria o de memoria, que está frecuentemente acompañada de un episodio febril y revela el agente etiológico del proceso infeccioso involucrado; por esto, a las determinaciones de anticuerpos frente a los microorganismos previamente mencionados, se les denomina reacciones febriles (1).

La prueba de Widal, es la prueba serológica clásica usada en el diagnóstico de infección por Salmonella (6). El género está dividido en 5 serotipos (A, B, C, D, E) en base a los antígenos O (somáticos), y en más de 1200 serotipos en base a los antígenos H (flagelares) (8). Los antígenos preparados a partir de organismos que contienen cada uno de los subgrupos o serotipos, son utilizados en la prueba de Widal para detectar anticuerpos en el suero del paciente (6).

Las aglutinaciones O, son de mayor importancia diagnóstica, porque aparecen cuando hay infección activa, y porque las aglutininas H, tienden a persistir más tiempo después de la vacunación, y no se producen siempre en la infección activa; los sueros que contienen tanto anticuerpos H, como anticuerpos O, tienen títulos mayores para el antígeno H (4). Los anticuerpos Vi o capsulares, son detectables en el suero de pacientes que se han recuperado de fiebres entéricas (3).

El método de elección para establecer el diagnóstico de infección por Brucella, es el aislamiento, pero pruebas repetidas de sangre pueden dar resultados negativos. La prueba diagnóstica más utilizada, es la prueba de aglutinación (6). Un antígeno simple (comunmente de Brucella abortus), se uti-

liza para preparar el reactivo para detectar Brucella (6). - Los anticuerpos se detectan usualmente en la segunda semana de la enfermedad aguda, alcanzando el máximo título, entre la cuarta y octava semana. Se obtienen reacciones cruzadas con anticuerpos de Francisella tularensis y Vibrio cholerae. Algunos antígenos de Brucella son idénticos a los de Yersinia enterocolica, y es imposible distinguir estos dos organismos por aglutinación (4). Para el diagnóstico de brucelosis, se han utilizado también las pruebas de hemaglutinación pasiva, el análisis de rosa de bengala y el ELISA (5).

El diagnóstico de una enfermedad por Rickettsia, depende del reconocimiento clínico, exposición reciente al artrópodo apropiado y/o un viaje o residencia en áreas endémicas (4). Las pruebas serológicas se utilizan para confirmar el diagnóstico (1).

En general los Ac frente a Rickettsia, aparecen al final de la primera semana del padecimiento clínico (6). La prueba más utilizada para la detección de la enfermedad es la prueba de Weil-Félix, basada en la reacción del Ac de Rickettsia, con el Ac frente a Ag polisacáridos (O somáticos) presentes en ciertas cepas de Proteus, encontrándose el OX₁₉ y el OX₂ en cepas de P. vulgaris, y OXK en cepas de P. mirabilis (4). Rutinariamente se emplea solamente el antígeno OX₁₉ (6).

El término fijación de superficie, se refiere a lo que ocurre cuando se produce reacción antígeno-anticuerpo, al aplicar sobre una mancha antigénica colocada en papel, un suero que contiene los anticuerpos correspondientes; el papel se suspende en un recipiente que contiene solución salina isotónica, la cual en su ascenso por adsorción, arrastra al antígeno hacia la parte superior del papel. Para tener

idea de la intensidad de la fijación del antígeno, se usa un suero control (7). La característica de la tira de papel filtro, adecuada para la prueba de fijación de superficie, es la de absorber por capilaridad ascendente, a una velocidad tal, que una tira de cinco pulgadas se humedezca en su totalidad en un lapso de 15 a 20 minutos (7).

Los antígenos se preparan con cepas seleccionadas de *B. abortus*, *S. typhi* y *proteus OX₁₉* (7). La *Brucella* se cultiva en los medios tripticase o albimi, incubándose 48 horas. La *Salmonella* y *Proteus* pueden cultivarse en medios menos estrictos, como son el ENDO o el EMB, por 24 horas.

El antígeno de *Brucella* se recoge en solución salina formolada y se tiñe con hematoxilina. El antígeno de *Salmo*nella se recoge en solución salina, se trata con azul de tetrazolio y con alcohol, para inactivarla y destruir los flagelos. El antígeno de *Proteus* se recoge también en solución salina, se tiñe con tetrazolio rojo, y se trata con alcohol etílico. Se ha demostrado que estos métodos de coloración son los más adecuados (7).

Las suspensiones bacterianas se centrifugan, y el sedimento se mezcla con sacarosa, con el objeto de evitar el contacto directo de las bacterias con el papel, que impediría practicar la reacción antígeno-anticuerpo (7). En el papel se imprimen círculos de aproximadamente 4 mm. de diámetro, a un cm. de la orilla y con una separación de un cm. entre cada círculo y se aplica el antígeno. El papel impreso con antígeno, puede servir durante periodos de más de un año, siempre que se conserve en lugar seco y protegido contra la humedad y los insectos. En las zonas tropicales el papel debe mantenerse en aparatos desecadores o protegidos en envases impermeables (2).

La prueba de aglutinación en placa se basa en el principio de que la bacteria en presencia de sus anticuerpos

correspondientes, se agregará a sus determinantes antigénicos. Es una prueba muy fácil de efectuar, sin embargo es conveniente confirmar los resultados con la prueba macroscópica en tubo, que permite determinar la concentración relativa del anticuerpo (4). Cuando se obtienen reacciones francamente negativas, deben ser reportadas como tales (6).

Una sola muestra analizada, en ausencia de un cuidadoso estudio de la historia del paciente respecto a la inmunización e infección previas, da una limitada información, porque la presencia de anticuerpos puede indicar una previa infección o una historia de inmunización contra el patógeno en cuestión (1). Por lo tanto es muy importante titular el suero en la etapa temprana de la enfermedad y compararlo con la muestra obtenida en la etapa tardía de la enfermedad (6).

Fundamento: El suero de pacientes con accesos febriles, se aplica sobre las manchas antigénicas impresas en papel de Salmonella, Brucella y Proteus. Al suspender el papel sobre un recipiente con solución salina isotónica, ésta asciende por adsorción, arrastrando a la parte superior el antígeno. Cuando están presentes anticuerpos específicos en el suero, el antígeno queda sujeto al papel en el sitio de su impresión, o sube distancias que son inversamente proporcionales al contenido de anticuerpos en el suero. Un suero control - permite conocer por comparación, la intensidad de la fijación.

La aglutinación en placa se realiza con los mismos antígenos utilizados en la fijación de superficie. En caso de existir los anticuerpos correspondientes en el suero, se obtiene una agrupación visible.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Suero problema, 2 ml.

Suero Control con anticuerpos frente a Brucella, Salmonella y OX₁₉, 2 ml.

Solución salina isotónica.

1 papel filtro que contiene las manchas coloreadas de los antígenos: Brucella, S. typhi y OX₁₉ (de izquierda a derecha).

Material:

1 asa de alambre de 3 mm de diámetro.

1 pipeta capilar.

3 pipetas Pasteur.

1 pinza o soporte.

2 pipetas de 1 ml graduadas.

2 portaobjetos.

1 caja de Petri.

Cinta adhesiva.

Aplicadores.

1 regla o escuadra.

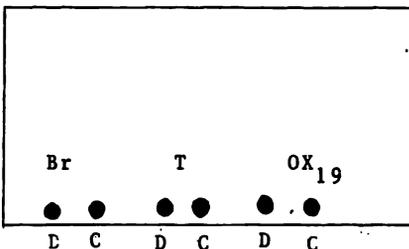
Equipo:

Lámpara.

METODOLOGIA

I. REACCION DE FIJACION EN SUPERFICIE (M. RUIZ CASTAÑEDA)

Papel filtro con manchas antigénicas



Br=Ag de Brucella
(violeta)
T=Ag de S. typhi
(azul)
OX₁₉=Ag de Proteus
(rojo)
D=Suero desconocido
C=Suero control.

1. Colocar una gota de suero problema con una asa de 3 mm. de diámetro o con una pipeta capilar, en las manchas correspondientes al suero desconocido.

2. En las manchas coloridas para el suero control, colocar una gota con el asa o pipeta capilar, de cada uno de los controles correspondientes.

3. Sumergir el extremo inferior del papel, colocándolo en posición vertical (por medio de un pedazo de cinta adhesiva que se adhiere a cualquier soporte), en solución salina antes de que se sequen los sueros; debe cuidarse que el líquido no llegue a los antígenos. La reacción se va a manifestar al pasar el líquido por capilaridad.

4. El tiempo de corrimiento debe ser de 15 a 20 minutos.

II. AGLUTINACION EN PLACA.

Br	T	OX ₁₉
D	D	D
C	C	C

Br=Ag de Brucella.

T=Ag de S. typhi.

OX₁₉=Ag de Proteus.

D=Suero desconocido.

C=Suero control.

1. Colocar 0.04 ml del suero del paciente para cada uno de los antígenos que se utilizan, y 0.04 ml de suero control para los antígenos investigados, en el lugar correspondiente (ver esquema).

2. Añadir una gota de cada antígeno al suero problema y control, en el lugar adecuado.

3. Mezclar con aplicadores diferentes cada muestra.

4. Observar la aglutinación con ayuda de una lámpara.

Resultados:

Fijación de superficie:

La reacciones negativa cuando las manchas se diluyen hacia arriba, hasta el nivel del líquido, después de 15 a 20 minutos.

La reacción es positiva cuando el antígeno que reacciona, no sube a los límites superiores y queda retrasado o completamente fijo. Si una mancha queda completamente fija, la reacción es 100% positiva. La distancia recorrida por los controles se divide en cuatro partes, por lo cual la cola de la mancha puede tener una longitud de 100, 75, 50 o 25%, y la intensidad de la reacción es inversa a la longitud recorrida por la mancha.

En la brucelosis, cualquier título es significativo para todas las edades, indicando solamente presencia de anticuerpos. En caso de obtener un título mayor del 50%, significa que existe una infección activa.

Para el antígeno de Salmonella, un título del 100% indica tifoidea actual, el 75% es significativo como sospecha en todas las edades, un título del 50% sólo debe considerarse como indicación posible de infección en menores de 14 años, y el 25% debe considerarse en los tres primeros años de vida.

En el tifo, sólo tienen valor títulos muy altos que concuerdan con la clínica, aunque se han encontrado casos de tifo con reacciones débiles. Es conveniente confirmar los resultados con antígenos de Rickettsia.

REACCION DE FIJACION EN SUPERFICIE:

ANTIGENOS	TITULO DE ANTICUERPOS (%)	INTERPRETACION
-----------	---------------------------	----------------

Brucella		
----------	--	--

Salmonella typhi		
------------------	--	--

OX ₁₉		
------------------	--	--

AGLUTINACION EN PLACA:

ANTIGENOS	RESULTADOS (+ 0 -)	INTEPRETACION
Brucella		
Salmonella typhy		
OX ₁₉		

Cualquier aglutinación en placa debe ser confirmada con la prueba en tubo antes de reportar el resultado.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la diferencia entre las reacciones de precipitación y aglutinación?
2. ¿Cómo se define la concentración de un anticuerpo -- aglutinante?
3. ¿Qué objeto tiene el empleo de colorantes en la preparación de los antígenos bacterianos?
4. ¿Cómo se preparan el antígeno flagelar y el antígeno somático de Salmonella?
5. Cite las especies de Brucella que pueden ser detectadas empleando el antígeno de B. abortus.
6. Mencione los antígenos de Proteus, utilizados para diferenciar las distintas especies rickettsiales.
7. ¿Cuál es el objeto de mezclar con aplicador los antígenos y anticuerpos colocados en la placa?
8. ¿Cuáles son las fuentes de infección por Salmonella?
9. ¿Cuánto tiempo persisten los anticuerpos somáticos de Salmonella en los individuos inmunizados activamente?
10. Mencione el fundamento de una prueba comercial, empleada en la determinación de las reacciones febriles.

DISCUSION

Tanto la prueba de aglutinación en placa, como la prueba de fijación en superficie, son pruebas sumamente sencillas en su elaboración, requieren de pequeñas cantidades de reactivos y poco tiempo de ejecución. En el caso de Salmonella, la prueba de Widal es útil en el diagnóstico, si se demuestran aglutininas O en presencia de síntomas clínicos, requiriéndose el cultivo del microorganismo, para tener una conclusión final. En la prueba de fijación de superficie, una prueba positiva debe juzgarse teniendo en cuenta la intensidad de la fijación y la edad del paciente. En niños es frecuente observar pruebas negativas a la aglutinación, con reacción de fijación en superficie, francamente positiva.

En el caso de Brucella, la prueba más utilizada en el diagnóstico, es la aglutinación, pero produce reacciones cruzadas con anticuerpos de Francicella tularensis y de Vibrio cholerae, y en algunos casos, los antígenos de Brucella son idénticos a los de Yersinia enterocolica, siendo imposible discriminar entre ambos microorganismos. La intensidad de la prueba de fijación en superficie, puede servir de base para juzgar sobre el estado actual de la infección. La prueba es por sí sola, índice práctico para el diagnóstico de la brucelosis humana y frecuentemente la primera evidencia de que un paciente sufre esta infección. Un resultado negativo descarta la posibilidad de una infección activa por Brucella, pero no elimina la posibilidad de que la infección pueda existir tanto en su fase aguda como crónica.

Para Rickettsia, el antígeno usado rutinariamente es el OX₁₉. La reacción de Weil-Félix no debe considerarse como criterio definitivo de infección por Rickettsia, por que los anticuerpos de Proteus se presentan en un alto porcentaje de la población en títulos bajos, por lo cual no deben ser sig-

nificativos y sólo tendrán valor presuncional, cuando sean francamente positivos, requiriéndose la confirmación con antígenos de Rickettsia.

BIBLIOGRAFIA

1. Gell P. G. H., Coombs R. R. A. y Lachmann P. J. Clinical Aspects of Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
2. Gutiérrez T. G., Benavides L., Kumate J. y Rangel L. Encuesta Inmunológica en la Población Infantil. Investigación de anticuerpos contra S. typhosa por medio de la reacción de fijación en superficie. Bol. Med. Hosp. Infantil, 19:105, 1962.
3. Ormsbee R. y col. Serologic diagnosis of epidemic typhus fever. Am. J. Epidemiol., 105:261, 1977.
4. Peacock E. J. y Tomar H. R. Manual of Laboratory Immunology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger. 1980.
5. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.
6. Rose R. N. y Bigazzi E. P. Methods in Immunodiagnosis. 1a. edición. U.S.A. Ed. John Wiley & Sons. 1973.
7. Ruiz Castañeda M. Reacciones Inmunológicas sobre Papel Filtro. Fijación en Superficie. Acd. Nac. Med., 2:199, 1964.
8. Todd C. J., Sanford H. S. y Davidsohn D. B. Clinical Diagnosis and Management. 17a. edición. U.S.A. Ed. W. B. Saunders Company. 1979.

PREPARACION DE UNA AUTOVACUNA BACTERIANA

Objetivo: Llevar a cabo la preparación de una vacuna bacteriana, familiarizándose con las precauciones de manejo, cuidados y pruebas que requieren realizarse, para que pueda ser empleada satisfactoriamente sin ocasionar problemas, en ciertos padecimientos donde otra terapéutica no ha tenido éxito. Analizar las ventajas, desventajas y limitaciones de su aplicación.

Generalidades: Una autovacuna es una suspensión bacteriana, preparada a partir de las bacterias derivadas de la lesión de un paciente que tiene infección (11). Se utilizan en terapéutica cuando el tratamiento con antibióticos ha fracasado y se requiere obtener una respuesta inmune del organismo infectado (6). Es un paso a seguir para despertar la respuesta inmune contra la bacteria que está ocasionando la infección.

Con cierta frecuencia se solicita a los laboratorios bacteriológicos, la preparación de una autovacuna, especialmente en casos de enfermos con furunculosis o abscesos recurrentes, acné vulgaris, ostiomielitis, incisiones operativas infectadas, pielitis, cistitis, otitis media subaguda, gonorrea crónica, reumatismo gonorreico, bronquitis crónica, asma bronquial de origen bacteriano, y en las infecciones de los senos nasales accesorios (5). Los mejores resultados se han obtenido con *S. aureus*, que en la actualidad está presentando una alta resistencia a la antibioticoterapia (8). Las infecciones por pneumococo, estreptococo y los bacilos intestinales, ocasionalmente responden satisfactoriamente (10).

Las primeras vacunas, y aún muchas actuales, están preparadas con el microbio entero, inactivado de diversas maneras (calor, fenol, formol, beta-propionolactona, luz ultravioleta, alcohol, acetona, etc) (4). Esto nos da la señal de que no hay idea aproximada de factores importantes en la in-

munogenicidad profiláctica y se decide emplear al microbio completo, como en el caso de *Vibrio cholera*, las rickettsias, micoplasma y otros (1). Pero hay que considerar que en la inmunización contra algunas enfermedades, la alta toxicidad de los microorganismos representa una dificultad, debiéndose aislar el componente antigénico de menor toxicidad, o destoxificar un componente tóxico. Esto va a depender del tamaño y complejidad del antígeno (10).

El principio de inmunización es una masa antigénica preformada. La introducción generalmente parenteral de los microorganismos muertos no produce infección, pero estimula la producción de anticuerpos, en particular de IgG humoral, con una duración corta de la inmunidad. Se ha pensado que probablemente se produzca un estímulo antigénico más efectivo que el microorganismo infectante vivo y virulento, debido a una reacción del organismo, al introducirle una sustancia extraña a manera de proteínoterapia (6). La eficacia profiláctica de la autovacuna consiste en eliminar la infección y la enfermedad, o disminuir la gravedad del cuadro clínico (7).

En cuanto a las precauciones y manejos requeridos en la preparación de la autovacuna, se debe tomar en cuenta qué medio de cultivo es el adecuado para un buen desarrollo del microorganismo infectante; se debe tener la certeza de que la cepa aislada está pura y hay que evitar su contaminación.

A continuación debe efectuarse el proceso de esterilización, teniendo cuidado de no sobrepasar las condiciones de esterilización, que pueden ocasionar daño en la fracción antigénica (11).

La vacuna debe estandarizarse, pudiendo realizar este paso antes o después de la esterilización. Para esta finalidad existen diversas técnicas como son el método nefelométrico de Mc Farland, el método hemacitométrico, el método de centrifu-

gación en tubo de Hopkins, y el método de Wright en portaobjetos, basado en la comparación de la cantidad de bacterias con la de eritrocitos de un volumen igual (5).

Se deben tener cuidados en la dilución para evitar contaminación. Las concentraciones usuales para vacunas de *S. aureus* son de 1000 millones/cm³, y para la mayoría de las otras bacterias de 100 millones/cm³ (8).

Deben realizarse controles biológicos de la autovacuna terminada, con la finalidad de prevenir efectos adversos en el paciente, y fundamentalmente son: la prueba de esterilidad para confirmar que todos los microorganismos han sido inactivados y que no hay contaminación; y la prueba de seguridad para desechar la posibilidad de existencia de sustancias tóxicas o pirogénicas, y comprobar que no existe peligro de infección y mucho menos de muerte. La vacuna debe guardarse en refrigeración y no se debe utilizar después de 4 meses de su preparación (9).

Por ser la autovacuna no replicativa, requiere la aplicación de varias dosis. En el caso de *S. aureus*, generalmente la primera dosis es de 50 millones, y la dosis máxima es de 1000 millones. Para otras bacterias la primera dosis es de 5 a 10 millones, y la dosis máxima de 100 millones (5).

Se aplica la autovacuna una o dos veces a la semana; pueden aplicarse pequeñas dosis los demás días (3). Para obtenerse mejores resultados, pueden emplearse adyuvantes (1).

Las autovacunas están contraindicadas en infecciones muy agudas, particularmente en aquellas con intoxicación sistémica, donde la producción de anticuerpos llegó al límite (10).

Fundamento: El microorganismo causante de una infección, se aísla de la lesión del paciente, en medios de cultivo adecuados para su desarrollo. Se prepara una suspensión del microorganismo aislado, la cual se esteriliza mediante la aplicación de calor, y mediante colimetría se obtienen los datos

para calcular la concentración requerida de la autovacuna, para su inoculación posterior al paciente. Finalmente se realizan las pruebas de esterilidad y seguridad, para tener la certeza de que la autovacuna cumple estos requisitos, antes de utilizarla.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Medio de cultivo de infusión de cerebro-corazón-agar, 6 tubos.

Medio de cultivo de tioglicolato fluído, 2 tubos.

Medio de cultivo de Sabouraud, 2 tubos.

Solución salina isotónica estéril, 50 ml.

Solución de mercuritiosalicilato de sodio al 10%, 10 ml.

Colorantes para Gram.

Material biológico:

2 ratones blancos de 18 a 20 gramos de peso.

Material:

1 matraz Erlenmayer de 100 ml de capacidad, estéril.

1 embudo de 6 cm de diámetro, estéril.

4 capas de gasa, estéril.

1 tapón de algodón y gasa, estériles.

3 pipetas de 10 ml. graduadas en ml y en 1/10 ml, estériles.

3 pipetas de 1 ml. graduadas en 1/10 ml, estériles.

1 jeringa hipodérmica de 2 ml. estéril.

1 aguja hipodérmica número 23 de 1 1/2 pulgadas, estéril.

1 frasco de 30 ml con tapón de hule perforable, estéril.

Equipo:

Estufa a 37°C.

Baño con temperatura de 55-60°C.

Microscopio.

Colorímetro.

Toma de la muestra:

Siempre que esto sea posible, se procura hacer la toma de la muestra de un absceso cerrado, para evitar la presencia de microorganismos contaminantes. El primer paso consiste en efectuar una asepsia en el sitio donde se va a tomar la muestra, y en caso de ser un absceso cerrado, se drena éste; si se trata de una lesión abierta, la toma de la muestra se realiza en la zona más profunda del absceso que sea posible.

METODOLOGIA

1. Utilizando un tubo con un medio de cultivo rico, en este caso infusión de cerebro-corazón-agar, se siembra la muestra tomada del absceso. Se incuba de 24 a 48 horas a 37°C, y al cabo de este tiempo se hace un frotis que se tiñe con la técnica de Gram, para determinar la morfología y características tintoriales de los microorganismos infectantes.
2. Con el desarrollo contenido en el tubo anterior, se siembran otros cinco tubos con el mismo medio, procurando que el inóculo sea denso, y que el asa de platino recorra toda la superficie del medio, con objeto de obtener un desarrollo abundante. Se incuba en las mismas condiciones hasta tener un buen desarrollo, generalmente de 24 a 48 horas.
3. A cada tubo con desarrollo bacteriano, se le añaden aproximadamente 3 ml de solución salina isotónica estéril; esta cantidad depende de la abundancia del desarrollo obtenido, si este es escaso, el volumen será menor.
4. Se agitan cuidadosamente los tubos para desprender el desarrollo, que se recoge con una pipeta de 10 ml, estéril. La suspensión obtenida se filtra en el embudo a través de las capas de gasa, se retira el embudo del matraz y este se cierra con un tapón de algodón y gasa estéril.
5. Se toma una muestra de exactamente 1 ml de la suspensión,

y se coloca en una celdilla del colorímetro, se añaden 9.0 ml de solución salina isotónica, se lee el % de transmitancia para determinar la concentración de microorganismos y se anota este dato, posteriormente se calcula la cantidad de solución salina isotónica que debe añadirse para tener una concentración final de 1000 millones de microorganismos por ml.

6. Se coloca el matraz en un baño con temperatura de - - 56-60°C durante 60 minutos, agitando de vez en cuando. Este calentamiento tiene por objeto destruir la viabilidad de los microorganismos sin alterar su composición antigénica, por esto es importante regular cuidadosamente la temperatura del baño.

7. Al terminar el periodo de calentamiento, se toma una muestra de 0.5 ml de la suspensión y se siembra en un tubo con el mismo medio en que se cultivó inicialmente el microorganismo, y se incuba en las mismas condiciones durante 72 horas, para cerciorarse de que no quedan bacterias vivas. En caso de que se obtenga desarrollo, se administra otro periodo de calentamiento y se realizará nuevamente la prueba de viabilidad.

8. Se mide el volumen que se tiene de la suspensión de microorganismos, añadiéndole la cantidad de solución salina isotónica que se requiere para tener una concentración final de 1000 millones de microorganismos por ml, y solución de mercuritiosalicilato de sodio al 10% para tener una concentración final de 1:10000, como conservador.

CONTROLES BIOLÓGICOS DE LA VACUNA TERMINADA

Prueba de esterilidad:

1. Tomar 4 ml de la vacuna terminada y sembrar 0.5 ml en cada uno de los tubos con medio de tioglicolato fluido y -

dos tubos con medio Sabouraud.

2. Incubar los tubos con medio de tioglicolato fluído a 37°C durante 7 días, y los tubos con medio Sabouraud a temperatura ambiente por un periodo igual. Si la vacuna está estéril, y no aparece ningún desarrollo en los cuatro tubos, la prueba se considera satisfactoria.

Prueba de seguridad:

1. Inyectar 1.0 ml de la vacuna por vía intramuscular a dos ratones blancos de 18 a 20 gramos de peso. Estos animales se tienen en observación durante 7 días. No debe producirse absceso en el sitio de la inoculación y el animal no debe presentar síntomas de estar infectado, ni morir.

Cuando la vacuna ha pasado satisfactoriamente estas pruebas, se procede a envasarla en frascos estériles con tapón de hule perforable y se conserva en refrigeración entre 2 y 10°C.

La dosis que se utiliza es generalmente de 0.1 ml y se aplica por vía intradérmica.

Resultados:

Si el microorganismo no ha sido identificado por su observación microscópica y colonial, deben seguirse los procedimientos bacteriológicos usuales para su total identificación.

La concentración de la autovacuna, que debe ser de aproximadamente 1000 millones/ml., se obtiene a partir del dato que se tiene al interpolar en una curva patrón, el valor de transmitancia leído, y se multiplica por la dilu--

ción que se hizo con solución salina isotónica (9 ml.) Para obtener la dilución requerida de 1000 millones de microorganismos por ml. se realiza el siguiente cálculo utilizando una regla de tres inversa:

$$10 \times 10^8 \text{ --- } 1$$

$$\text{Conc. obt. --- } X$$

X = Dilución requerida en ml.

Es igual al volumen que resulta de la suma de un ml. de la suspensión inicial de microorganismos más la cantidad de solución salina isotónica que debe añadirse para tener la concentración deseada.

REPORTE

Paciente:

Lesión:

Microorganismo identificado:

Fecha de preparación de la autovacuna:

Concentración inicial y final de la autovacuna:

Fecha de la prueba de seguridad:

Fecha de la prueba de esterilidad:

Resultado de la prueba de esterilidad:

CUESTIONARIO

1. ¿Desde el punto de vista inmunológico, cuál es el objeto de la aplicación de varias dosis de la autovacuna?
2. ¿Cuáles son las medidas de conservación y almacenamiento de las vacunas y porqué?
3. ¿Porqué se requiere una determinada concentración de la autovacuna, que sucedería si aplicáramos un exceso o una baja concentración de microorganismos?
4. Mencione 5 reactivos efectivos en la esterilización de las autovacunas.
5. Explique en detalle un método para determinar la concentración de microorganismos.
6. ¿Por qué va a diferir la concentración terapéutica en distintas bacterias?
7. De 5 ejemplos de vacunas preparadas a partir de inmunógenos puros.
8. ¿Qué son los extractos microbianos inmunogénicos y - mencione 5 microorganismos usados en su elaboración?
9. ¿De que depende el efecto terapéutico de las vacunas?
10. ¿Por qué se emplean el medio de tioglicolato y de Sabouraud de la prueba de esterilización?

DISCUSION.

La práctica tiene como utilidad fundamental el ejercicio del alumno en cuanto a la preparación de una vacuna, porque el vasto campo de la inmunización aun tiene mucho por avanzar. Con la práctica es posible determinar las condiciones a las que se enfrenta el Q.F.B., para preparar una autovacuna, pues requiere de un criterio tanto bacteriológico como inmunológico; la problemática que representa no es sólo la de seguir una técnica al pie de la letra, debiéndose profundizar en las condiciones existentes para que el resultado cumpla la finalidad deseada.

En un determinado no de padecimientos, donde no hay otro camino a seguir aparece la autovacuna, que permite tener la seguridad de que se está induciendo respuesta en contra del microorganismo infectante.

Tiene la ventaja de que el material empleado es muy accesible y puede montarse en un laboratorio sencillo, pues to que no requiere de equipo sofisticado.

La desventaja de esta técnica terapéutica se presenta fundamentalmente, por cuanto al tiempo que requiere de dedicación, porque solo tiene aplicación individual, porque solo es utilizada cuando otras técnicas fallan, como herramienta secundaria; no se han realizado estudios suficientes para darle mayor aplicación, los resultados no siempre son satisfactorios y no se ha podido llegar a una estandarización, pues aún se desconocen los mecanismos precisos de acción; tiene limitación terapéutica y es costosa.

Actualmente son muy utilizadas las preparaciones de alérgenos para el diagnóstico y tratamiento de pacientes alérgicos. Estos extractos de alérgenos aún no se han estandarizado en base a su potencia y se definen generalmente como unidades de nitrógeno proteico por ml de extracto, o bien como una relación peso/volumen.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Bellanti J.A. Inmunología II. 1a. edición, México. Ed. Interamericana, 1980.
- 2.- Boyd C.W. Fundamentals of Immunology. 1a. edición. U.S. A. Ed. Interscience Publishers. 1966.
- 3.- Evans D.G. Immunization against Infectious Diseases. Brit. Med. Bull., 25:1, 1969.

- 4.- Gell P.G.H., Coombs R.R.A. y Lachmann P.J. **Clinical - Aspects of Immunology.** 3a. Edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
- 5.- Gradwohl's R. **Clinical Laboratory Methods and Diagnosis.** 7a. Edición. U.S.A. Ed. C.V. Mosby Company, 1970.
- 6.- Humphrey H.J. y White R.G. **Immunology for for Students of Medicine.** 1a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1971.
- 7.- Kumate J. **Inmunidad, Inmunización, Vacunas,** 3a. edición México. Ed. Hospital Infantil de México, 1981.
- 8.- Lavoipierre G.J. y col. **A vaccine trial for neonatal -- staphylococcal disease.** Amer. J. Dis. Child., 122: - 337, 1971.
- 9.- Lloyd J.S. **Mejoramiento de los Métodos de Transporte y Almacenamiento en frio de las vacunas.** Crónicas de la OMS., 31, 1977.
10. Rose R.N. y Friedman H. **Manual of Clinical Immunology.** 2a. Edición. U.S.A. Ed. American Society For Microbio logy, 1980.
11. Todd C.J., Sanford H.S. y Davidsohn D.B. **Clinical Diag nosis And Management.** 17a. edición, U.S.A. Ed. W. B. Saunders Company, 1979.

FAGOCITOSIS DE NITROAZUL DE TETRAZOLIO.

Objetivo: Evaluar la fagocitosis, explicando la variedad de factores que están involucrados en ella, y relacionar las diversas patologías que originan o motivan los defectos fagocíticos, demostrando la capacidad de fagocitosis de los leucocitos polimorfonucleares mediante la reducción de NAT, explicando el fundamento bioquímico de este método. Interpretar los resultados que se obtienen y analizar las limitaciones de la técnica.

Generalidades: La endocitosis es el mecanismo mediante el cual la célula viva ingiere material externo y se puede dividir en dos categorías, de acuerdo al tamaño del material ingerido: la pinocitosis que se refiere a la captación de material soluble y la fagocitosis que es la ingestión de partículas (9).

En los mamíferos, la fagocitosis es la única función de ciertos leucocitos; en primer lugar se encuentran los leucocitos polimorfonucleares (neutrófilos) y el sistema mononuclear fagocítico que incluye promonocitos, monocitos y macrófagos tisulares. También los eosinófilos son capaces de fagocitar (10).

Los procesos involucrados en la fagocitosis son la quimiotaxis, el reconocimiento, la ingestión, la desgranulación y finalmente la digestión del material ingerido (10).

Las anomalías de los leucocitos polimorfonucleares, pueden dar como resultado un significativo aumento en la susceptibilidad a la infección. Para desarrollar su capacidad biológica completa, deben desarrollar 3 funciones mayores: a) movilizarse al sitio donde son requeridos, b) fagocitar y c) matar al agente infeccioso. Las pruebas de laboratorio para valorar la función del neutrófilo, caen en categorías que

miden estas tres funciones básicas. Para medir la movilización se han desarrollado las pruebas de (7): estimulación con epinefrina que mide la habilidad de obtener leucocitos de la fuente marginal; el estímulo por cortisona que mide las reservas medulares; la ventana de piel de Rebutck que estimula la respuesta de neutrófilos ante una inflamación local y los experimentos quimiotácticos que miden la capacidad de los leucocitos polimorfonucleares de responder a un estímulo quimiotáctico (10).

Para valorar la capacidad fagocítica, existen el método de fagocitosis de levaduras y la prueba de formazán, entre otras.

Para conocer la capacidad de matar al agente infeccioso, se utilizan bacterias, tales como S. aureus, E. coli, Listeria monocytogenes, etc.

La prueba de formazán o reducción de NAT, fue desarrollada por Baehner y Nathan en 1967, para medir la producción de NADPH+ H+, en los neutrófilos de sangre periférica de pacientes con granulomatosis crónica (2). Existen varias modificaciones de la técnica, de las cuales utilizaremos la de Gifford y Malawista (4).

La enumeración porcentual de los neutrófilos formazán positivos puede discriminar claramente entre los leucocitos de la población normal, y los procedentes de enfermos con granulomatosis crónica, en la cual los leucocitos polimorfonucleares muestran una deficiencia casi absoluta en uno o varios pasos enzimáticos del ciclo colateral de los fosfatos de la pentosa (1).

Al realizarse la fagocitosis, se presentan los siguientes eventos (1): Aumenta la producción de ácido láctico y disminuye el pH intracelular. Se estimula el ciclo colateral de los fosfatos de pentosa, que llegan a proporcionar hasta un

10% de la energía disponible. Aumenta el recambio de los fosfolípidos de la membrana.

Las microtécnicas con el procedimiento semicuantitativo, han demostrado que se encuentran porcentajes elevados de neutrófilos formazán -positivos en las infecciones bacterianas, en la tuberculosis miliar, en las micosis generalizadas, en el paludismo, en condiciones no asociadas con patología infecciosa, tales como infarto al miocardio, la administración de anticonceptivos, la osteogénesis imperfecta, etc (8).

Las condiciones en las cuales disminuye el porcentaje de leucocitos formazán positivos, corresponde a la granulomatosis crónica, al síndrome de Job, administración de drogas antiinflamatorias (aspirina, indometazina, corticoesteroides) y enfermedades como el Lupus Eritematoso Diseminado. En tuberculosis pulmonar, en infecciones virales y en micosis superficiales no se han encontrado variaciones significativas respecto a lo normal (9).

La reducción de NAT se encuentra ausente en ciertos pacientes que pierden la actividad de la glucosa -6- fosfato deshidrogenasa. Los acarreadores heterocigotos de esta enfermedad muestran sólo una menor conversión de la normal, por lo cual la prueba no es aplicable para determinar el estado de acarreador.

La prueba puede utilizarse para diferenciar enfermedades fébriles bacterianas, de las no bacterianas. (3).

Fundamento: En una gota de sangre capilar, los leucocitos polimorfonucleares al mezclarse con un colorante de óxido-reducción, el NAT, lo reducen produciendo gránulos de formazán de color azul oscuro que pueden observarse dentro del citoplasma de las células.

TECNICA

MATERIAL Y REACTIVOS.

Reactivos:

Sangre capilar del paciente.

Solución de nitroazul de tetrazolio (0.28 g en 100 ml de solución salina isotónica).

Solución salina isotónica.

Metanol absoluto.

Safranina (0.5 g en 100 ml de agua destilada).

Solución de trabajo de NAT (debe prepararse inmediatamente antes de la tinción):

Suero humano fresco (de no más de 24 horas), 5 ml.

Nitroazul de tetrazolio al 0.28%, 6 ml.

Solución salina isotónica, 3 ml.

Incubar a 37°C por 20 minutos.

Material:

2 cuentagotas.

2 pipetas de 5 ml.

1 portaobjetos.

1 lanceta.

1 caja de Petri.

Papel filtro.

Equipo:

Microscopio.

METODOLOGIA

1. Colocar una gota de sangre capilar en un portaobjetos, incubarla en cámara húmeda a 37°C por 25 minutos para que los granulocitos y los monocitos se adhieran al cristal. Es

conveniente realizar una biometría hemática de la sangre estudiada, para poder reportar el resultado como número absoluto de neutrófilos formazan positivos.

2. Lavar suavemente la sangre restante con solución salina usando pipeta, dejando caer gota a gota, secando el excedente de solución salina isotónica con papel filtro.
3. Cubrir los leucocitos adheridos al vidrio con solución de NAT. Incubar en cámara húmeda a 37°C por 25 minutos.
4. Se lava nuevamente el portaobjetos y se deja secar a temperatura ambiente, 5 minutos.
5. Para fijar las células se agrega a la preparación metanol absoluto (1 minuto). Lavar con agua corriente y secar al aire.
6. Teñir con safranina por 5 minutos como colorante de contraste. Lavar con agua corriente y secar al aire.
7. Observar al microscopio con el objetivo seco fuerte; contar 100 granulocitos, buscando acúmulos de formazan para considerar células positivas.

Resultados:

El resultado se reporta como porcentaje de células NAT positivas.

Granulocitos formazan positivos = _____%

Los valores de referencia son del 14 al 30%.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es el nitroazul de tetrazolio y que características tiene?
2. ¿Por qué debe prepararse inmediatamente antes de la tinción, la solución de trabajo con NAT?
3. ¿Cuál es el objeto de incubar una gota de sangre capilar del paciente en un portaobjetos, como primer paso de la técnica?

4. ¿Por qué se debe teñir la preparación de neutrófilos con safranina?
5. ¿Qué reacción bioquímica del neutrófilo evalúa la -- prueba de formazán?
6. ¿Cómo pueden separarse los granulocitos y los monocitos de la sangre?
7. Mencione alguna otra modificación de la técnica de reducción con NAT.
8. ¿Cuál es la prueba de nitroazul de tetrazolio estimulada?
9. ¿Qué trastornos bioquímicos se presentan en la fagocitosis por neutrófilos, en la enfermedad granulomatosis crónica?
10. Señale otra prueba utilizada para valorar la capacidad fagocítica de los neutrófilos.

DISCUSION

La determinación de la capacidad fagocítica de los neutrófilos, mediante el método de reducción de NAT, es una -- prueba muy sencilla, rápida y económica. Este tipo de estudio es esencial para determinar las anomalías de los fagocitos que varían enormemente.

Esta prueba es aplicable también a los monocitos fagocíticos.

La prueba está sujeta a grandes variantes y por lo tanto para efectuar la técnica debe hacerse un número adecuado de determinaciones de control, debiendo ser conservador en la interpretación de resultados.

Se deben probar los sueros contra células control, porque los sueros pueden contener factores inhibidores de la función del neutrófilo. Es conveniente reportar el número absoluto de neutrófilos NAT positivos, mediante la información

que proporciona la biometría hemática.

La prueba de NAT estimulada (con partículas de látex), presenta la ventaja de dar un rango dos o tres veces mayor de células formazán positivas, que permite hacer una mejor diferenciación de la patología.

BIBLIOGRAFIA

1. Baehner R. L., Boxer L. A. y Davis J. The Biochemical basis of Nitroblue Tetrazolium Reduction in Normal Human and Chronic Granulomatous Disease Polymorphonuclear Leukocytes. Blood, 48:309,1976.
2. Baehner R. L. y Nathan D. C. Quantitative Nitroblue Tetrazolium in Chronic Granulomatous Disease. New Engl. J. Med.,278:971, 1968.
3. García Tamayo F., Ayala L. y Kumate J. La prueba de Nitroazul de Tetrazolio en la amibiasis hepática de los niños. Bol. Med. Hosp. Infantil, 31(4):683,1974.
4. Gifford R. H. y Malawista S. E. A simple rapid micro-method for detecting chronic granulomatous disease of childhood. J. Lab. Clin. Invest., 75:511,1969.
5. Lynch J. M. y col. Métodos de Laboratorio. 2a. edición México. Ed. Interamericana. 1972.
6. Matula G. y Paterson P. Spontaneous in vitro reduction of nitroblue tetrazolium by neutrophils of adult patients with bacterial infection. New Eng. J. Med.,285:311,1971.
7. Miller M. E. Neutrophil function. Clin. Immunobiol., 3:427,1976.
8. Park B. H. The use and limitations of the nitroblue tetrazolium test as a diagnostic aid. J. Pediatrics, 78:376, 1971.

9. Peacock E. J. y Tomar H. R. Manual of Laboratory Immunology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger. 1980.
10. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.

AGLUTINACION DE ANTICUERPOS HETEROFILOS EN PAPEL.

DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE MONONUCLEOSIS INFECCIOSA.

Objetivo: Analizar el fundamento de la técnica de aglutinación de anticuerpos heterófilos en la determinación de mononucleosis infecciosa, y realizar una técnica de Davidsohn modificada en un suero problema, para el diagnóstico de la enfermedad.

Señalar otros métodos serológicos utilizados en el diagnóstico de mononucleosis infecciosa y evaluar las ventajas y limitaciones de la técnica a desarrollar.

Generalidades: En la mononucleosis infecciosa, se presentan anticuerpos frente al virus Epstein Barr (EBV), que persisten por años. Estos son anticuerpos heterófilos que se forman en respuesta a neo-antígenos, que aparecen en las células infectadas con EBV, y que reaccionan con el antígeno de la superficie de eritrocitos de borrego, caballo y buey (1). Por definición, los anticuerpos heterófilos, son anticuerpos que reaccionan con antígenos similares, que aparecen en dos o más especies relacionadas. Se producen en general, en respuesta a un antígeno de una especie, y reaccionan con el mismo antígeno proveniente de una fuente diferente (5). Los anticuerpos del sistema ABO y la reagina de la sífilis, son anticuerpos heterófilos. Todos pertenecen a la clase de inmunoglobulina IgM (8).

La reacción de anticuerpos heterófilos, representan la base de la mayoría de pruebas diseñadas para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa (3). Los anticuerpos heterófilos aparecen en el suero del 85 a 90% de adolescentes y adultos con mononucleosis clásica, y en un número menor de infantes con la enfermedad (9).

El título de anticuerpos heterófilos, alcanza generalmente niveles significativos de diagnóstico, al final de la primera semana de la enfermedad y tiene su nivel máximo entre la segunda y tercera semana (2).

Los anticuerpos heterófilos se presentan ocasionalmente en el suero de algunos sujetos normales y en pacientes con la enfermedad del suero en diversas enfermedades reumáticas, por lo cual en situaciones clínicas de prueba, es necesario diferenciar los anticuerpos heterófilos (1).

Las pruebas tradicionales para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa, fueron desarrolladas por Paul, Bunnell y Davidsohn (3).

La prueba de Paul-Bunnell se realiza para detectar la presencia y título de anticuerpos heterófilos (7). Las pruebas que resultan positivas con la prueba de Paul-Bunnell, se sujetan a la prueba diferencial de Davidsohn, que utiliza una absorción diferencial, lo que aumenta la precisión, al eliminar muchos anticuerpos no específicos (3).

En la prueba de Paul-Bunnell de título presuntivo, una suspensión de eritrocitos de borrego, se hacen reaccionar con diluciones del suero del paciente. La aglutinación indica la presencia de anticuerpos heterófilos (7).

En la prueba diferencial de Davidsohn, el suero de pacientes que pueden tener mononucleosis infecciosa, se hacen reaccionar con antígeno de riñón de cobayo y con una suspensión del estroma de eritrocitos de buey. El antígeno de riñón de cobayo, absorbe el anticuerpo Forssman y los anticuerpos de la enfermedad del suero (ambos anticuerpos heterófilos), eliminando sólo parcialmente los anticuerpos de mononucleosis infecciosa. El estroma de eritrocitos de buey, absorbe los anticuerpos de la mononucleosis infecciosa y de la enfermedad del suero (4).

La absorción se mide por la pérdida de habilidad para aglutinar eritrocitos de borrego. Este es un método laborioso porque requiere diluciones seriadas de reactivos y varias absorciones del suero (6).

ANTICUERPOS HETEROFILOS ABSORBIDOS POR (5):

Anticuerpo	Riñón de cobayo	Eritrocitos de buey
Forssman	si	no.
Mononucleosis infecciosa	no	si
Enfermedad del suero.	si	si

Se han encontrado ventajas al usar eritrocitos de caballo, porque son más sensibles y específicos que los eritrocitos de borrego para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa (4).

Se han desarrollado pruebas comerciales para medir los anticuerpos de la mononucleosis infecciosa, con objeto de obtener un diagnóstico rápido, entre las cuales existen el mono-test, el mono-diff, el mono-spot, el confirmikit y otros que emplean eritrocitos de caballo.

Es recomendable practicar la prueba de la mancha en papel, que es un procedimiento sencillo, basado en la aglutinación de células formalinizadas de caballo, después de la absorción con antígeno de riñón de cobayo y eritrocitos de buey (4).

La mononucleosis infecciosa es una enfermedad aguda del sistema reticuloendotelial, cuyo agente causal es el virus Epstein-Barr (EBV), un herpesvirus con DNA de doble hélice, que tiene distribución mundial (8). En infantes la infección primaria es generalmente asintomática. Ciertos pacientes desarrollan una enfermedad neoplásica asociada con EBV, en forma de linfoma de Burkitt y carcinoma nasofaríngeo (9). Exis-

ten firmes evidencias que sugieren una relación causal entre el EBV y estos dos cánceres humanos; factores genéticos y ambientales influyen en la expresión de esta enfermedad - (8). La transmisión de mononucleosis infecciosa se realiza por medio de células infectadas presentes en la saliva. El periodo de incubación de la mononucleosis infecciosa es de 42-49 días (2). El diagnóstico de esta enfermedad, se realiza en base a tres criterios característicos: síntomas clínicos, manifestaciones hematológicas y resultados serológicos (5).

Se utilizan procedimientos serológicos en el estudio de esta enfermedad, por las siguientes razones (9):

1. Para determinar la susceptibilidad o inmunidad frente a mononucleosis infecciosa.
2. Para determinar la relación etiológica de un síndrome de mononucleosis negativo, para anticuerpos heterófilos y el EBV.
3. Para determinar la implicación del EBV como agente etiológico en una variedad de síndromes clínicos con etiología indefinida, como son la hepatitis, la encefalitis, la polineuritis infecciosa, la púrpura trombocitopenica idiopática, la anemia hemolítica y otros asociados con la infección de este virus.
4. Para determinar la susceptibilidad o inmunidad a la infección, en primates inoculados experimentalmente con EBV.
5. Para determinar la presencia de antígenos de la expresión del EBV en líneas celulares linfloblastoides.
6. Como herramienta epidemiológica en poblaciones específicas, se han empleado en particular métodos seroepidemiológicos, para distinguir pacientes con tumores asociados con el EBV, que tienen una infección inaparente.

Fundamento: El suero de pacientes de los cuales se sospecha tienen mononucleosis infecciosa, se hace reaccionar con una gota de suspensiones de antígenos de riñón de cobayo y de estroma de eritrocitos de buey, separadamente en dos etiquetas de papel. El antígeno de riñón de cobayo, absorbe los anticuerpos Forssman y los anticuerpos de la enfermedad del suero, mientras que el estroma de eritrocitos de buey, absorbe los anticuerpos de la enfermedad del suero y los anticuerpos de la mononucleosis infecciosa. La absorción se demuestra por la pérdida de la capacidad del suero de aglutinar eritrocitos de caballo, que reaccionan con los anticuerpos heterófilos. La aglutinación de los eritrocitos de caballo con el suero absorbido con antígeno de riñón de cobayo, se debe a la presencia de anticuerpos de mononucleosis infecciosa, en tanto que la aglutinación de los eritrocitos de caballo con el suero absorbido por estroma de eritrocitos de buey, indica la presencia de anticuerpos Forssman.

TECNICA

REACTIVOS Y MATERIAL.

Reactivos:

Suero problema.

Antígeno de riñón de cobayo: Se prepara suspendiendo - dos riñones de cobayo en suero fisiológico, en una caja de Petri previamente enfriada y pesada para poder calcular posteriormente el peso del tejido. Los riñones se lavan con suero fisiológico hasta que el sobrenadante no contenga sangre, y se muelen hasta obtener una pulpa fina, con la cual se prepara una suspensión al 20% en suero fisiológico, que se hierve una hora a baño María, compensando el volumen perdido por evaporación con agua destilada. Se agrega fenol para obtener una suspensión al 0.5% y se guarda en refrigerador, donde puede permanecer meses sin pérdida de propiedades.

Estroma de eritrocitos de buey.-Se prepara agregando a los eritrocitos, cinco volúmenes de agua destilada enfriada en hielo seco. Se dejan reposar 30 minutos y se ultracentrifugan a 15000 rpm, lavando con agua destilada en frío, las veces necesarias para eliminar rastros de hemoglobina. Se suspenden en poco volumen de agua destilada y se sonifican. Se lavan una vez con amortiguador salino de fosfatos 0.15 M a pH de 7.2, volviendo a centrifugar y resuspendiendo en el amortiguador. Si presentaran grumos, pueden centrifugarse lentamente. Esta suspensión puede utilizarse satisfactoriamente por seis meses, si se mantiene en congelación. El día de la prueba, se lavan tres veces con solución de NaCl al 0.9%

Eritrocitos de caballo.- Se preparan colocando cinco partes de sangre de caballo, en seis partes de citrato al 3.8%. Es conveniente utilizar los eritrocitos de caballo en vejecidos, de dos a tres meses después de su preparación. El día de la prueba se lavan tres veces con solución de NaCl al 0.9% (la solución nunca queda limpia).

Material:

2 etiquetas de papel adheribles.
2 pipetas Pasteur.
2 micropipetas de 30 μ l.
1 micropipeta de 10 μ l.
Palillos.

Equipo:

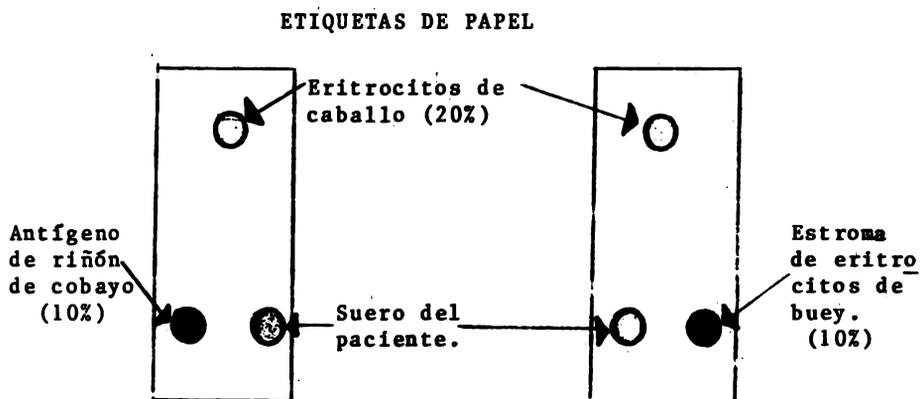
Cronómetro.
Lámpara.

METODOLOGIA

TECNICA DE DAVIDSOHN MODIFICADA.

1. En el extremo de cada una de las dos etiquetas de papel de 1 x 3 pulgadas, se coloca una gota de 10 μ l de eritrocitos de caballo al 20%.

2. En la esquina de una etiqueta, se pone una gota con mi cropipeta de 30 μ l, de la suspensión de antígeno de riñón de cobayo al 10%.
3. En la segunda etiqueta, se coloca una gota de 30 μ l de estroma de eritrocitos de buey al 10%.
4. Se aplica una gota de suero cerca de cada antígeno usa do en la absorción.



5. Con un palillo se mezclan el suero y los antígenos, con cuidado de no rayar el papel.
6. Después se mezclan con los eritrocitos de caballo y se esparcen uniformemente sobre toda la superficie.
7. Se utiliza un cronómetro, con el cual se miden dos minutos y se anota el tiempo exacto en el que ocurre la aglutina ción. En caso de no presentarse aglutinación a los dos minutos, se considera la reacción negativa.

Resultados:

Después de la absorción con antígeno de riñón y cobayo y estroma de eritrocitos de buey respectivamente, las aglutina ninas de caballo muestran una clara diferenciación entre sue ros de pacientes con mononucleosis infecciosa y sin mononu-- cleosis infecciosa.

En caso de tener el suero problema estudiado, anticuerpos heterófilos de mononucleosis infecciosa, la etiqueta de papel con la suspensión de riñón de cobayo, presentará aglutinación visible antes de dos minutos, mientras que la etiqueta que contiene la suspensión de estroma de eritrocitos de buey, resulta positiva si existen anticuerpos heterófilos de Forssman presentes en el suero.

SUERO ABSORBIDO CON ANTIGENO DE	TIEMPO DE AGLUTINACION CON ERITROCITOS DE CABALLO:
Riñón de cobayo	
Estroma de eritrocitos de buey.	

PRUEBA: _____

CUESTIONARIO

1. ¿Por qué es recomendable realizar la técnica de Davidsohn modificada, tras obtener un resultado positivo con la prueba de Paul-Bunnell?
2. ¿Qué hallazgos hematológicos indican una posible mononucleosis infecciosa?
3. ¿Cuáles son los anticuerpos heterófilos?
4. ¿Qué es el antígeno Forssman?
5. ¿Cómo se prepara la suspensión del estroma de eritrocitos de buey?
6. ¿Por qué se ha preferido utilizar eritrocitos de caballo en lugar de eritrocitos de borrego?
7. ¿Cuáles son las ventajas de utilizar etiquetas de papel en la prueba?
8. ¿Con qué objeto se mezcla primero el suero problema con la suspensión de estroma de eritrocitos de buey, y con anti-

geno de riñón de cobayo, respectivamente en cada etiqueta, y posteriormente se hace reaccionar con eritrocitos de caballo?

9. Mencione el fundamento de alguna prueba comercial diseñada para detectar anticuerpos heterófilos.

10. Señale otras técnicas empleadas en la identificación de anticuerpos que aparecen en la mononucleosis infecciosa.

DISCUSION

El número de pruebas solicitadas para el diagnóstico de mononucleosis infecciosa, en general no es alto, por lo cual se ha requerido desarrollar una prueba simple, pero útil. La reacción de anticuerpos heterófilos, es la base de la mayoría de pruebas usadas en el diagnóstico de mononucleosis infecciosa. Estos anticuerpos aparecen en el suero del 85 al 90% de adolescentes y adultos jóvenes con mononucleosis clásica y en un pequeño número de infantes enfermos. La aparición de anticuerpos heterófilos en pacientes que presentan datos clínicos y hematológicos típicos de esta enfermedad, proporcionan una fuerte evidencia de infección.

La modificación de Davidsohn para los anticuerpos heterófilos, es una prueba de rápida y sencilla ejecución, el resultado es fácil de leer y puede ser archivado. Es una prueba que ofrece mayor sensibilidad que los equipos comerciales accesibles.

Esta técnica requiere de varios reactivos biológicos - en pequeñas cantidades, que tienen la ventaja de poderse al macenar bastante tiempo en condiciones adecuadas.

En esta prueba se han utilizado eritrocitos de caballo, porque detectan anticuerpos en un periodo mayor de tiempo, durante el curso de la enfermedad, en comparación con los eritrocitos de borrego, que se utilizan en la prueba de Paul Bunnell y son menos sensibles.

BIBLIOGRAFIA

1. Davidsohn I. y Lee C.L. Serologic Diagnosis of Infectious Mononucleosis. The Am. J. of Clin. Pathol., 41 -- (2):115, 1964.
2. Evans A. S. y col. A prospective evaluation of heterophile and Epstein-Barr virus specific IgM antibodies in clinical and subclinical infectious mononucleosis: specificity and sensitivity of the tests and persistence of antibodies. J. Infect. Dis., 132:546, 1975.
3. Lee C.L., Davidsohn I. y Slaby R. Horse Agglutinins in Infectious Mononucleosis. The Am. J. of Clin. Pathol., 49 (1): 3, 1968.
4. Lee C.L., Davidsohn I. y Panczyzyn O. Horse Agglutinins in Infectious Mononucleosis. The Am. J. of Clin. Pathol., 49 (1):12, 1968.
5. Lynch J.M. y col. Métodos de Laboratorio. 2a. edición. México. Ed. Interamericana. 1972.
6. Myhre A. B. y Nakayama V. Serologic Evaluation of the Mono-Chek Test. The Am. J. of Clin. Pathol., 65:987, 1976.
7. Paul J. R. y Bunnell W. W. The presence of heterophile antibodies in infectious mononucleosis. Am. J. Med. Sci., 189:90, 1932.
8. Peacock E. J. y Tomar H. R. Manual of Laboratory Immunology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger. 1980.
9. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.
10. Agradezco la comunicación personal de Brauer Sandra, que desarrolla en la actualidad el tema, como proyecto de tesis.

TECNICAS ESPECIALES

Los inmunoanálisis que utilizan isótopos radiactivos, enzimas o compuestos fluorescentes, permiten adquirir una gran cantidad de información acerca de los mecanismos de la patología y actividad funcional del sistema inmune.

Al irse desarrollando mejores reactivos para estas técnicas especiales recientes, va surgiendo un mayor entendimiento de como funciona el sistema inmune, tanto en condiciones de salud como de enfermedad.

Al incrementarse el desarrollo de estos inmunoanálisis, muchos procedimientos actuales caerán en desuso, debido a las ventajas que tienen la inmunofluorescencia, el radioinmunoanálisis y el enzimoimmunoanalysis sobre ellas.

Estos inmunoanálisis no serán solamente importantes en el laboratorio de inmunología sino que tendrán aplicaciones sumamente útiles, en los laboratorios de química, hematología y microbiología, entre otros, utilizándose con finalidades diagnósticas, principalmente.

La inmunofluorescencia se usa ampliamente en la detección de anticuerpos y antígenos en enfermedades infecciosas y autoinmunes, mientras que el radioinmunoanálisis ocupa un lugar especial en el análisis de hormonas y drogas. El enzimoimmunoanálisis, es el método que emplea reactivos marcados más reciente, y tiene aplicaciones en las áreas cubiertas previamente por la inmunofluorescencia y el radioinmunoanálisis.

INMUNOFLUORESCENCIA (IF)

La inmunofluorescencia es una técnica que fue creada por Coombs y colaboradores en 1942, para el estudio de los antígenos bacterianos en los tejidos (8). Es una técnica - histoquímica que consiste en conjugar ciertos colorantes - fluorescentes con anticuerpos (es lo más común), o con antígenos (en raras ocasiones), exponiendo después el conjugado a los antígenos o anticuerpos correspondientes, en cortes o impresiones de tejido, frotis de microorganismos o de células, o cultivo de tejido en monocapa; se observa una - fluorescencia en el foco de interacción antígeno-anticuerpo (2).

En los últimos años, la inmunofluorescencia, donde un compuesto fluorescente se utiliza como marcador, ha sido recomendado como método alternativo del radioinmunoanálisis. Se han desarrollado análisis de hormonas, drogas y proteínas con importancia diagnóstica. En la actualidad, la sensibilidad de los métodos de inmunofluorescencia, permiten detectar sustancias presentes en concentraciones de 10^{-12} M, o menos (8). Los avances que se han alcanzado, se deben al desarrollo y mejoramiento de la instrumentación utilizada, y a la selección de diferentes sustancias fluorescentes para marcar los anticuerpos o antígenos (1).

La fluorescencia, es la capacidad que tienen ciertos - compuestos naturales o sintéticos, para absorber luz de ciertas longitudes de onda y emitir luz de mayor longitud de onda, en alrededor de 10^{-8} segundos (5). La longitud de onda emitida, es característica de cada compuesto fluorescente, y cada uno tiene una eficiencia de quantum, o radio de energía luminosa emitida por la energía absorbida, que es típica para cada fluorocromo.

Entre los fluorocromos que se utilizan para realizar la inmunofluorescencia están la fluoresceína, el ácido 1-

dimetilaminonaftalen 5-sulfónico (DANS), y la rodamina B de lisamina (RB 200). La fluoresceína, con una eficiencia de quantum cercana al 85%, es la sustancia más popular usada en microscopia fluorescente (6). Los reportes acerca de su rango de mayor absorción varían, pero emite luz con longitud de onda de 520 nm, que aparece de color verde amarillento, al ojo humano; tiene dos ventajas sobre los otros fluorocromos; primero: su emisión a 520 nm está en el área de máxima sensibilidad visual, y segundo, la autofluorescencia verde amarillenta es rara, por lo cual las lecturas falsas de este fenómeno disminuyen (1).

La fluoresceína debe ser conjugada a un anticuerpo antes de poderse utilizar en la técnica de inmunofluorescencia. Este paso va acompañado de la preparación de isotiocianato de fluoresceína (FITC), un compuesto fluorescente que tiene afinidad para proteínas, por vía de su componente cianato (2). El FITC puede ser agregado a una preparación de anticuerpos, y el complejo o conjugado resultante, es capaz de reaccionar con el antígeno para el cual se preparó el anticuerpo. La pureza y especificidad del anticuerpo, determina la especificidad de reacciones subsecuentes con el conjugado fluorocromo-proteína (6).

Es conveniente realizar la purificación del conjugado fluorocromo-proteína, antes de utilizarlo en la prueba. Para tal efecto se ha empleado la diálisis, que elimina las sales del amortiguador y el solvente del fluorocromo, y la extracción con carbón o filtración en columna de Sefadex, para eliminar la sustancia fluorescente que no reaccionó (8).

Debe efectuarse una absorción del conjugado fluorocromo-proteína, con polvos de tejidos, antes de utilizarlo en la reacción de inmunofluorescencia, con objeto de eliminar los anticuerpos inespecíficos presentes (2).

Rara vez es necesario, realizar la concentración del conjugado fluorocromo-proteína, pero en caso de requerirse, se utiliza para tal efecto, la precipitación con sales (7).

Las pruebas de estabilidad del conjugado fluorocromo-proteína, indican larga duración en todas sus fases (liofilizado o líquido), si es mantenido a temperaturas de $\leq 4^{\circ}\text{C}$.

Se han desarrollado varias técnicas que utilizan los conjugados fluorescentes, a partir de la prueba original de Coons y colaboradores, entre las cuales se incluyen (6):

La técnica directa, donde se usa un anticuerpo conjugado para detectar la presencia de su antígeno correspondiente. Aunque es una técnica fácil de realizar, requiere el uso de muchos controles para asegurar la especificidad del conjugado fluorocromo-proteína. Con este método pueden identificarse anticuerpos o antígenos de microorganismos y de tejidos.

La técnica indirecta, que tiene la ventaja de aprovechar la capacidad de los anticuerpos de actuar como antígenos en algunas especie animal diferente. Es una técnica útil, porque un conjugado puede ser usado para identificar muchos complejos antígeno-anticuerpo, y por que es más sensible que la técnica directa, aplicándose en la investigación de anticuerpos frente a muchos microorganismos asociados con enfermedades humanas, y para detectar autoanticuerpos.

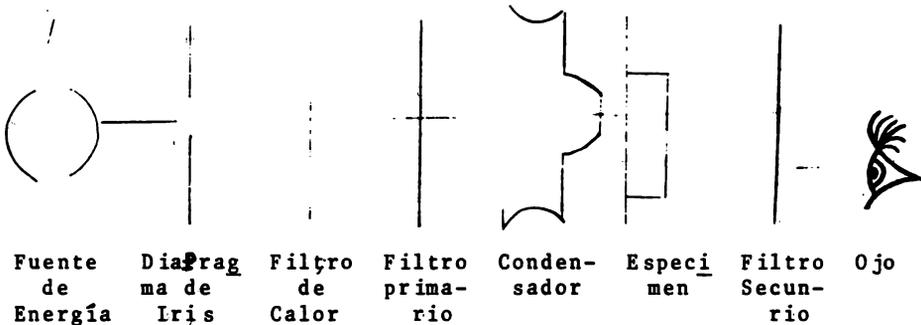
La técnica del complemento, donde se produce la reacción antígeno-anticuerpo capaz de fijar complemento, y los componentes de este último, unidos al complejo, son detectados - utilizando un antisuero conjugado para el complemento. La técnica del complemento es más sensible que la técnica indirecta, por la amplificación que origina el sistema del complemento, pero al añadir un reactivo extra (complemento), se requieren más controles.

La prueba de inhibición, que está basada en la teoría de que el grado en que un suero desconocido puede bloquear la -

reacción entre un antígeno conocido y su anticuerpo conjugado, está en relación equivalente del contenido de anticuerpos en dicho suero. La presencia de anticuerpos en una muestra desconocida, da como resultado una disminución o desaparición de la fluorescencia. Es una técnica mucho menos sensible que la técnica indirecta.

La técnica del sandwich, donde un anticuerpo presente en el tejido es identificado, al hacerlo reaccionar con un antígeno conocido y posteriormente marcar ese antígeno con un anticuerpo conjugado.

El equipo de microscopia de fluorescencia, es esencial para la observación de laminillas preparadas con las técnicas previamente descritas. Los microscopios para fluorescencia varían en sus componentes necesarios, pero en general son los siguientes (5):



Las principales dificultades que aparecen en la microscopia por fluorescencia, incluyen la fluorescencia no específica, la autofluorescencia y las reacciones cruzadas (7). La autofluorescencia es producida por materiales biológicos sin marcar, incluyendo un amplio rango de longitudes de onda; este fenómeno puede ser eliminado, realizando apropiadamente la prueba, controlando la dilución, el pH y otras variables (7).

La tinción no específica, o el teñido de materiales sin la unión antígeno-anticuerpo, es generalmente mínima cuando se

trabaja con bacterias o hongos, y aumenta cuando se observan protozoarios o cultivos de tejidos; posiblemente este fenómeno es ocasionado por el efecto de carga ácida-básica entre las proteínas (7).

Las reacciones cruzadas pueden ocurrir, cuando están presentes antígenos iguales o similares en la reacción; esto se puede controlar mediante fraccionación del suero, o por purificación del antígeno (7).

Los procedimientos de inmunofluorescencia han sido desarrollados con sensibilidad equivalente o mayor, que en ciertos procedimientos de radioinmunoanálisis, para hormonas, drogas y proteínas de importancia diagnóstica (2).

Algunas ventajas de la inmunofluorescencia, son las siguientes (3):

1. Los reactivos que se utilizan en la determinación, tienen una vida media más larga, en comparación con reactivos marcados radioactivamente.
2. El método puede ser automatizado, obteniendo gran velocidad y precisión en los análisis.
3. Se puede desarrollar un sistema homogéneo de inmunofluorescencia, para antígenos proteícos complejos. El sistema homogéneo, eliminará el paso de separación de unión y desunión del antígeno con el anticuerpo. Se pueden realizar análisis homogéneos similares por la técnica de ELISA, pero son muy difíciles de elaborar.
4. Los sistemas de inmunofluorescencia pueden desarrollarse para cuantificar múltiples constituyentes rápidamente en una sola muestra.

Entre algunas desventajas de la inmunofluorescencia se tienen, el alto costo de la instrumentación especial utilizada para el desarrollo del análisis, y que el anticuerpo mar-

cado con el fluorocromo, debe estar purificado y estandarizado, para obtener la sensibilidad específica y precisión requeridas (6).

La inmunofluorescencia se ha utilizado para estudios de toxoplasma, treponema, depósitos de anticuerpos en riñón, anticuerpos antinucleares, para enumerar poblaciones de linfocitos y en dermatología para estudios de vasculitis y liquen plano, entre otros (3).

CUESTIONARIO

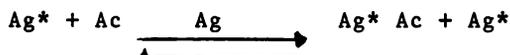
1. ¿Qué tipos de filtros pueden ser utilizados en un microscopio de inmunofluorescencia?
2. Describa un método de conjugación, y la purificación del conjugado obtenido.
3. ¿Además de la fluoresceína, que otros fluorocromos se utilizan en la inmunofluorescencia?
4. Explique el fundamento de la determinación de un antígeno en fase sólida por inmunofluorescencia.
5. Esquematice la técnica de inmunofluorescencia con complemento.
6. ¿Qué fijadores se utilizan en inmunofluorescencia de tejidos?
7. ¿Cuáles son los componentes de un microscopio para inmunofluorescencia?
8. ¿Qué técnica de inmunofluorescencia se utiliza en el diagnóstico de la sífilis?
9. Mencione una aplicación de la inmunofluorescencia en el diagnóstico de enfermedades de origen bacteriano, viral y autoinmune.
10. Señale algún uso de la inmunofluorescencia en la determinación de hormonas y drogas.

BIBLIOGRAFIA

1. Curry R. E. y col. A system approach to fluorescent immunoassay: general principles and representative applications. Clin. Chem., 25:1591,1979.
2. Lynch J. M. y col. Métodos de Laboratorio. 2a. edición. México. Ed. Interamericana. 1972.
3. Nakamura R. M., Dito W. R. y Tucker E. S. Immunoassays in the Clinical Laboratory. 1a. edición. U.S.A. Ed. Alan R. Liss Inc. 1979.
4. Nargessi R. D., Landon J. y Smith D. S. Use of antibodies against the label in non-separation non-isotopic immunoassay of proteins. J. Immunol. Methods, 26:307,1979.
5. Peacock E. J. y Tomar H. R. Manual of Laboratory Immunology. 1a. edición. U.S.A. Ed. Lea & Febiger. 1980.
6. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.
7. Soini E. y Hemmila I. Fluoroimmunoassay: present status and key problems. Clin. Chem. 25:353,1979.
8. Weir D. M. Handbook of Experimental Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1978.

RADIOINMUNOANÁLISIS (RIA).

El radioinmunoanálisis (RIA) fue descrito por primera vez en 1959 por Yalow y Berson, aplicado a la cuantificación de insulina, haciendo uso de los radioisótopos para marcar el antígeno y aumentar la sensibilidad en la medición de la reacción antígeno-anticuerpo (1). Pertenece a un grupo de análisis basados en el principio de competencia entre un ligado, marcado radioactivamente y un ligando sin marcar, por una proteína de unión. En este caso la proteína de unión es un anticuerpo específico y el ligando, el antígeno correspondiente. La concentración de reactivos es tá controlada al alcanzarse el equilibrio (7):



Este análisis es extremadamente sensible y específico para detectar reacciones antígeno-anticuerpo; en algunos casos pueden medirse hasta picogramos (10^{-12} g) (7). Su sensibilidad deriva de la radioquímica y su especificidad de la reacción serológica (2).

En la realización del radioinmunoanálisis, se requiere utilizar un material marcado radioactivamente de calidad, que aumenta la sensibilidad y precisión del análisis (2).

Las sustancias radioactivas son únicas en su emisión de partículas, en su vida media, y en el sistema usado para detectarlas. Se pueden clasificar como emisores de partículas α , β o γ (7).

Para el marcaje radioactivo se utilizan diferentes radioisótopos. Los que se utilizan con mayor frecuencia son el ^{131}I y el ^{125}I (8). En ciertos procedimientos se han marcado también los péptidos con ^3H , ^{14}C y ^{35}S (10).

La intensidad de la emisión de partículas radioactivas se puede medir en términos de partículas producidas, de e-

nergía liberada por unidad de tiempo, o en base a su actividad específica que se define como la cantidad de radioactividad por cantidad de compuesto. La unidad básica de radioactividad es el Curie (Ci), que es una medición del número de desintegraciones radioactivas por segundo. Un Curie es igual a 3.7×10^{10} desintegraciones/segundo, lo que corresponde a la radioactividad de un gramo de radio. Como esta unidad es demasiado grande para fines prácticos, se divide en milicurie (mCi), que es igual a 3.7×10^7 desintegraciones/segundo, y microCurie (μ Ci), que es igual a 3.7×10^4 desintegraciones/segundo. Se utilizan también unidades como son las desintegraciones por minuto (dpm), donde 2.2×10^6 dpm es igual a 1μ Ci, y las cuentas por minuto (cpm), que equivalen a dpm \times eficiencia del conteo. La Comisión Internacional de Unidades Radiológicas (ICRU), define a la unidad de radioactividad del Sistema Internacional (SI), como el becquerel (Bq), que es igual a 1 desintegración/segundo. $1 \text{ Ci} = 3.7 \times 10^{10} \text{ Bq}$. Como el becquerel es una unidad muy pequeña, se utilizan múltiplos, como son el kilobecquerel (kBq) = 10^3 desintegraciones/segundo, el megabecquerel (MBq) = 10^6 desintegraciones/segundo y el gigabecquerel (GBq) = 10^9 desintegraciones/segundo. Cuando se define la radioactividad en función de su actividad específica, la radioactividad se expresa en las unidades previamente descritas, y la cantidad de compuesto en gramos, moles o sus correspondientes submúltiplos (9).

Para medir la radioactividad se emplean contadores - - Geiger, detectores de centelleo, y detectores del estado sólido (5).

El desarrollo del radioinmunoanálisis para una sustancia específica, depende del acceso a un antisuero que contenga anticuerpos con una adecuada afinidad, título y especificidad. Para producir el antisuero deben inmunizarse animales con la sustancia en cuestión, que puede emplearse sin modificar o modificada, con objeto de aumentar la inmunogenicidad (10). - El conejo y el cobayo son los animales más utilizados para prepararlo (8).

En el radioinmunoanálisis de una hormona, ésta, para inyectarse, no requiere ser completamente pura (en algunos casos extractos glandulares producen los mejores resultados). Por regla general, de 0.25 a 1 mg de hormona o su extracto, - es inyectada en un medio especial como es la solución de - Freund. La vía de administración varía, pero por lo general se utiliza la vía subcutánea, en varios sitios del animal, cada 2 o 3 semanas. La obtención de un buen antisuero puede tomar de 3 a 6 meses, o más (8).

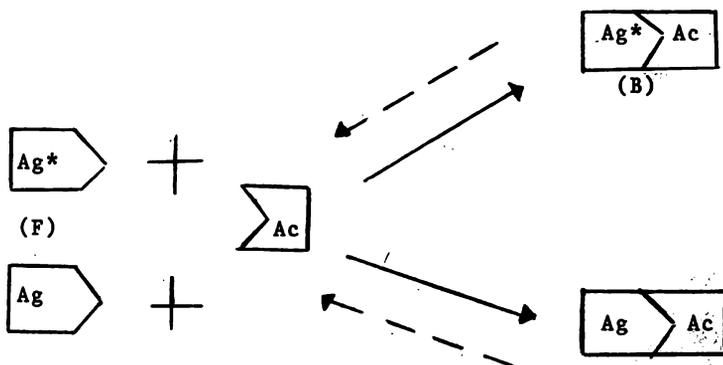
Una vez obtenido el antisuero, es necesario determinar el título de dilución ideal. Para esto, diluciones en concentraciones progresivamente crecientes de antisuero, son incubadas con concentraciones constantes de hormona radioactiva. En forma gráfica, se obtiene así una curva sigmoidal, cuya parte superior corresponde a una gran concentración de anticuerpos y que por estar en exceso, se unirán a toda la hormona marcada. Al otro extremo de la curva el antisuero muy diluido tiene un poder de conjugación muy bajo. El título de dilución del antisuero ideal para la prueba, es aquel con el cual se obtiene una ligadura de 30 al 50% de la hormona radioactiva, o un cociente ligado/libre de 0.7 a 1.5 (1/1) - - (10). Lo que se trata de obtener, es una concentración de anticuerpos tal, que tanto la hormona a medirse como la marcada, compitan por igual por los anticuerpos presentes en el antisuero (8).

Un paso fundamental de la técnica, consiste en marcar radioactivamente los peptidos y proteínas. Para tal efecto se han desarrollado varios métodos químicos, entre los cuales están el método con cloramina-T, el método con el reactivo de Bolton-Hunter, la electrolisis con corriente constante el método enzimático con lactoperoxidasa y glucosa-oxidasa (10). Es obvio que el material marcado radioactivamente debe tenerse en forma pura, y es conveniente almacenarlo en soluciones amortiguadoras isotónicas a un pH que proporcione estabilidad (4).

Debe utilizarse la determinación de inmunoreactividad de las proteínas radioiodinadas, usando dos diluciones del antisuero: con un exceso de anticuerpo y con la dilución de trabajo. La actividad específica puede ser estimada, conociendo la masa de la hormona y las cuentas por minuto de ^{125}I , introducida en la mezcla de reacción (3).

En general, la técnica consiste en lo siguiente: se preparan simultáneamente los tubos de ensaye que servirán de estándar y los que llevarán la muestra a determinarse (sea plasma, orina, etc. preparadas en forma especial), todos en duplicado o triplicado. A todos los tubos se agrega una solución amortiguadora. A los tubos que constituirán la curva estándar, se agregan concentraciones crecientes de la hormona estándar que se desea medir, y al resto un volumen constante de las muestras. Finalmente, a ambas series de tubos se agrega la misma concentración de hormona radioactiva y del antisuero. Se inicia luego la incubación a 4°C por un tiempo determinado, que puede durar de uno a cinco días dependiendo de la hormona, de las características del antisuero, etc. Por regla general, mientras menor es la cantidad de marcador radioactivo y mas alto el título de dilución del antisuero, mayor deberá ser el periodo de incubación. Se procede finalmente a la separación de las fracciones ligada y libre de la hormona radioactiva, tanto en los tubos estándar, como en los que contienen la muestra (8).

REACCION DEL RADIOINMUNOANALISIS (8).



Ag* = Antígeno marcado.

Ag = Antígeno no marcado.

Ac = Anticuerpo.

(F) = Fracción Libre.

(B) = Fracción Ligada.

Después de realizar la reacción competitiva, es necesaria la separación de las fracciones ligada y libre del antígeno marcado radioactivamente, para poder determinar el cociente de equilibrio entre ambos. Este procedimiento debe realizarse rápida y completamente, para establecer un cociente exacto (7). Los métodos utilizados con este fin, aprovechan la diferencia de tamaño molecular, carga, adsorción o solubilidad del complejo formado (9). Los radioinmunoanálisis varían en la forma en como se realiza esta separación. Algunos métodos usados en la separación del antígeno marcado libre y ligado en el radioinmunoanálisis incluyen (2):

- 1.- Separación por carga: cromatografía electroforesis, electroforesis, resinas de intercambio iónico, fraccionamiento en sales.
- 2.- Separación por su tamaño molecular: cromatografía en gel, filtración en microporo.
- 3.- Sistemas de anticuerpos en fase sólida: pre-precipitado del anticuerpo doble, anticuerpo polimerizado, unión co

valente del anticuerpo al poliestireno, celulosa, absorción del anticuerpo en la superficie de tubos de poliestireno o polietileno.

- 4.- Separación por propiedades inmunológicas: doble anticuerpo y segundo anticuerpo de fase sólida.
- 5.- Separación por adsorción en superficies: talco, sílica microprecipitada, celulosa, nitrato de celulosa, gel - de fosfato de zirconilo.
- 6.- Separación por solubilidad en solventes orgánicos: etano, dioxano.
- 7.- Técnicas misceláneas: proteólisis enzimática.

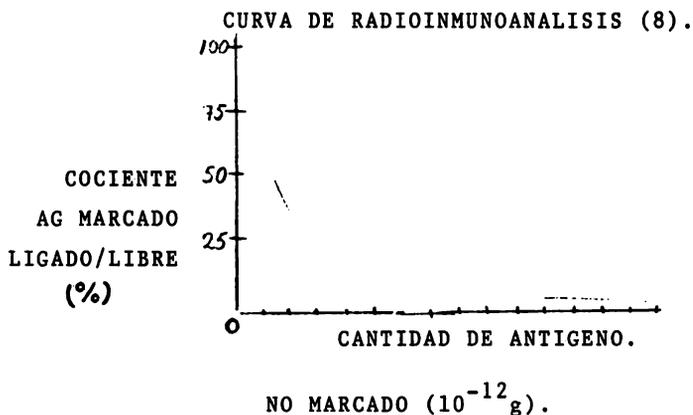
La elección de la técnica depende de varios factores que incluyen: el efecto del procedimiento en el equilibrio de la reacción inmunológica, interferencia de las sustancias presentes en el plasma, como sales, urea, proteína plasmática y complemento, efectos en la variación de la concentración de proteína y el volumen que puede ser manejado. También el tiempo y el costo son consideraciones que afectan la elección del sistema.

Los procedimientos de separación mas empleados, son los del anticuerpo doble, cromatoelectroforesis, absorción de sílica, y las técnicas de anticuerpo en fase sólida (9).

Luego de separadas, las fracciones ligadas y libre se cuentan separadamente durante un tiempo fijo (generalmente un minuto), en un contador automático de centelleo de radiación gamma, comunmente.

Los valores obtenidos tanto para la solución estándar - como para las muestras, son registrados tanto en papel aritmético como semilogarítmico y logit, y se obtiene así la curva estándar, en la cual la radioactividad o el cociente de antígeno ligado/libre disminuye en función de la con-

concentración de la hormona en la muestra. Finalmente, la concentración de la hormona en cada una de las muestras analizadas, se obtiene al comparar la relación de antígeno ligado/libre de cada muestra, con el cociente del antígeno ligado/libre obtenido con la solución estándar (8).



Un paso importante en el radioinmunoanálisis, es la toma y el manejo de las muestras. En ciertos análisis se pueden obtener resultados erróneos por hemólisis, lipemia y por adición de ciertos anticoagulantes (9).

Para preparar soluciones de los reactivos, se requiere un equipo volumétrico con gran precisión y exactitud, en el rango de volúmenes en que se emplea cada pieza. Los reactivos deben mezclarse en forma efectiva pero no destructiva. (10).

Es esencial comparar las potencias del radioinmunoanálisis y el bioanálisis de patrones conocidos y desconocidos de muestras biológicas, para determinar si el radioinmunoanálisis mide únicamente el material biológico activo, o también material inmunológico que da reacción cruzada (5).

Durante los últimos veinte años, los métodos de radioinmunoanálisis y la purificación de las sustancias marcadas -

se han desarrollado enormemente, contribuyendo al progreso de la medicina y en especial de la endocrinología (8). - Existen muchas variaciones del clásico método del radioinmunoanálisis; estas incluyen la purificación y marcado del anticuerpo en lugar del antígeno, o adición secuencial del antígeno marcado, después de alcanzar el equilibrio del -- anticuerpo y el antígeno desconocido (5).

El radioinmunoanálisis se ha aplicado al análisis de - hormonas polipeptidas, otras hormonas no polipepticas, drogas, vitaminas, nucleótidos cíclicos, enzimas, virus, antígenos tumorales, proteínas séricas y otras proteínas y haptenos, tanto en el hombre, como en otras especies (11).

A continuación se enlistan algunas sustancias medidas por radioinmunoanálisis (11):

- Hormonas pituitarias (hormona de crecimiento).
- Hormonas coriónicas (ganado tropina, coriónica humana).
- Hormonas pancreáticas (insulina).
- Hormonas calcitropicas (calcitonina).
- Hormonas gastrointestinales (gastrina).
- Hormonas de tejidos vasoactivos (angiotensinas).
- Hormonas tiroideas (tiroxina).
- Esteroides (corticosteroides).
- Aminas biológicas (serotonina).
- Drogas (depresivos del sistema nervioso central).
- Vitaminas (cianocobalamina).
- Enzimas (tripsina).
- Virus (antígeno asociado a la hepatitis).
- Antígenos tumorales (antígeno carcinoembriogénico).
- Proteínas séricas (inmunoglobulinas).
- Otras (entero toxina estafilocócica).

CUESTIONARIO.

- 1.- Explique un método empleado para marcar proteínas radioactivamente.
- 2.- Describa la reacción de iodinación de una proteína.
- 3.- ¿Qué problemas se presentan en la producción del antisuero empleado en el radioinmunoanálisis?
- 4.- ¿Cuál es el criterio a seguir para elegir la especie animal adecuada en la producción de anticuerpos?
- 5.- Señale algunas proteínas empleadas como acarreadoras, conjugadas con el hapteno.
- 6.- ¿Qué precauciones deben tenerse con el material radioactivo?
- 7.- ¿Cómo puede evitarse el daño producido en los reactivos involucrados en el radioinmunoanálisis, durante la incubación?
- 8.- ¿En qué consiste el análisis inmunoradiométrico?
- 9.- Explique la prueba radioinmunoabsorbente en papel.
10. Mencione algunas desventajas de la técnica del radioinmunoanálisis.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Berson, S.A. y Yalow R. S. Quantitative aspects of the reaction between insulin and insulin binding antibody. J. Clin. Invest., 38:1996, 1959.
- 2.- Gell P. G. H., Coombs R. R. A. y Lachmann P. J. Clinical Aspects of Immunology. 3a. edición. Great Britain. Ed. Blackwell Scientific Pub. 1975.
- 3.- Heber D., Odell W. D., Schedewie H. y Wolfsen R. A. Improved iodination of peptides for radioimmunoassay and membrane radioreceptor assay, Clin. Chem., 24:794, 1978. ✓

- 4.- Herney A. E. y Clayton H. A. J. Trounble shooting radio-lingand assays. Clin. Chem., 24:1275, 1978.
- 5.- Jaffe B. M. y Behrman H. R. Methods of hormone radioim-munoassay. 1a. edición. U. S. A. Ed. Academic Press - Ind. 1979.
- 6.- Mushahwar I. K. y col. Prevalence of hepatitis B anti-gen and its antibody as detected by radioimmunoassay. - J. Med. Virol., 2:77, 1978.
- 7.- Peacock E. J. y Tomar H. R. Manual of Laboratory Immuno-gy. 1a. edición. U. S. A. Ed. Lea & Febiger. 1980.
- 8.- Pikler M. G. El radioinmunoensayo. Rev. Invest. Clin., ✓ 25 (1):51, 1973.
- 9.- Roadbard D. Symposium on Radioimmunoassay and Related - Procedures in Medicine. 1a. edición. U. S. A. Ed. In-ternational Atomic Energy Agency. 1977.
10. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U. S. A. Ed. American Society for Microbio-logy. 1980.
11. Yalow S. R. Radioimmunoassay: A Probe for the Fine - - ✓ Structure of Biologic Systems. Science, 200:1236, 1978.

ENZIMOINMUNOANALISIS (EIA)

Engvall y Perlmann desarrollaron en 1971, un método inmunológico que utiliza el anticuerpo unido a una enzima, con objeto de localizar una gran variedad de sustancias antigénicas, en tejidos o fluidos corporales (3).

Los análisis que utilizan antígenos, haptenos o anticuerpos marcados con enzimas, se han aplicado recientemente en la medición de sustancias en fluidos biológicos. A estos análisis se le han dado varios nombres como son: enzimo-inmunoanálisis (EIA), inmunoanálisis de unión enzimática, inmunoanálisis de marcador enzimático, inmunoanálisis de enzima acoplada, análisis inmunoenzimático y análisis utilizando inmunoabsorbente y enzima unida - (ELISA). Existe un tipo de inmunoanálisis enzimático homogéneo, donde a diferencia de otros tipos de análisis, no se requiere separación del material marcado, libre y unido, al cual se le ha llamado técnica de inmunoanálisis de enzima multiplicada (EMIT), o inmunoanálisis de inhibición enzimática (10).

A continuación se hace referencia a la técnica de - ELISA, que es la más utilizada en la actualidad y que se basa en la capacidad que tienen los anticuerpos o antígenos de unirse a una enzima, manteniendo el complejo formado tanto la actividad inmunológica como la enzimática, - siendo indispensable que el antígeno o el anticuerpo puedan acoplarse a un soporte de fase sólida, para facilitar la separación entre los reactivos unidos y libres (3). Después de formar un complejo por incubación de los reactivos que participen, se agrega un sustrato enzimático específico, que da como resultado un producto soluble de - reacción, susceptible de ser medido por su densidad óptica.

ca, lo que proporciona el dato de la cantidad de anticuerpos o antígenos específicos en el fluído de prueba (6).

El ELISA se ha clasificado en análisis homogéneos y heterogéneos, de acuerdo a la separación de los reactivos que participan. En los análisis homogéneos, la enzima se conjuga con un hepteno, y cuando este conjugado reacciona con un anticuerpo, se modifica la actividad enzimática. Este tipo de análisis presenta la característica de no requerir separación entre la porción unida y la porción libre, y se restringe al análisis de sustancias con bajo peso molecular. En el análisis heterogéneo, un paso esencial consiste en la separación de reactivos unidos con enzimas, de los reactivos libres de marca (5).

Existen una gran variedad de análisis elaborados a partir del fundamento del ELISA (2,10).

Para determinar anticuerpos, se han clasificado los siguientes métodos (5):

I. Método Indirecto.- Se utiliza para medir conjugados con enzimas marcadas con antiglobulina humana. El procedimiento consiste en: absorber el antígeno al plato, lavar, agregar suero con cualquier anticuerpo específico que se acopla al antígeno, lavar, agregar la enzima marcada con antiglobulina que se acopla al anticuerpo, lavar y agregar sustrato. La cantidad de sustrato hidrolizado, es equivalente al anticuerpo presente.

II. Método Competitivo.- El antígeno se aplica a la fase sólida; el conjugado de anticuerpo específico unido a una enzima se mezcla con la muestra problema que puede contener anticuerpos y se incuba con la fase sólida, que se lava posteriormente, y se agrega el sustrato. La diferencia entre el sustrato degradado y el conjugado solo, más la muestra, es proporcional a la cantidad de anticuerpo en la muestra.

III. Método Anti-IgM.- Este método es útil cuando el anticuerpo IgM se encuentra en una gran proporción en el suero. Se efectúa, recubriendo la fase sólida con la globulina de un antisuero frente a IgM, el suero de prueba se incuba con la fase sólida sensibilizada y se lava; se agrega el antígeno marcado con enzima y a continuación se añade el sustrato enzimático. La degradación del sustrato, es proporcional a la cantidad de anticuerpo IgM en la muestra.

En la determinación de antígenos, se tienen los siguientes métodos (5):

I. Método Competitivo.- En este análisis el anticuerpo específico se une a la fase sólida, el conjugado antígeno-enzima se mezcla con la muestra que posiblemente contiene antígeno, la mezcla se incuba en la fase sólida, se lava y se agrega el sustrato enzimático. La diferencia entre el sustrato degradado con el conjugado solo, y el conjugado más la muestra, es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

II. Método del Emparedado (Sandwich) con doble Anticuerpo.- El anticuerpo específico se une a la fase sólida, la muestra de prueba se incuba con la fase sólida y se lava, el conjugado de anticuerpo específico unido a una enzima, se incuba, se lava, y se adiciona el sustrato enzimático. La degradación es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

III. Método de Inhibición.- El antígeno de referencia se une a la fase sólida, el conjugado de referencia de anticuerpo específico con enzima se mezcla con la muestra que contiene antígeno y se incuba con la fase sólida, se lava y se agrega el sustrato. La diferencia de la degradación entre las muestras del antígeno de referencia con el conjugado solo, y el conjugado más la muestra, es proporcional a la cantidad de antígeno en la muestra.

Tanto los antígenos como los anticuerpos, pueden ser unidos covalentemente a la fase sólida constituida por un material particulado (8). Se utilizan soportes de celulosa, de poliacrilamida, de nylon, de poliestireno, de propileno, de polivinilo, de vidrio microcristalino, de hule siliconizado y otros plásticos (2). Se puede obtener una adsorción pasiva satisfactoria en tubos, discos o microplacas y se ha observado que el poliestireno y el polivinilo proporcionan los soportes más adecuados (9).

Las condiciones óptimas para recubrir la fase sólida (por ejemplo: concentración del reactivo, tiempo, temperatura y pH), se deben determinar con titulaciones que utilizan reactivos de referencia (2). El exceso de reactivo puede eliminarse, mediante lavado con Tween PBS; el material sensibilizado puede usarse inmediatamente o almacenarse en recipientes adecuados a 4°C por periodos de más de un año (10). La enzima utilizada debe tener una elevada actividad, un precio económico y ser accesible en forma pura.

Se han empleado una gran variedad de enzimas, entre las cuales se incluyen la acetil-colinesterasa, la β -D galactosidasa del citocromo C, la glucoamilasa, la glucooxidasa, la β -D glucuronidasa, la lactato-deshidrogenasa, la gluco 6-fosfato deshidrogenasa, la fosfatasa alcalina, la lisozima y la peroxidasa de rábano (10). De ellas, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano, son favoritas, y en especial la última, por su bajo costo, porque es fácil de conjugarse, por su estabilidad, y porque actúa sobre una gran variedad de sustratos (9).

Para preparar los conjugados, se utilizan agentes de unión cruzada, de los cuales los más populares son el glutaraldehído y el periodato de sodio (5). Los conjugados

se conservan estables por muchos meses y hasta por años, de preferencia en forma concentrada (8). Para purificar los conjugados, se puede realizar la precipitación por sales, o la filtración de gel (9).

La elección del sustrato en este inmunoanálisis es crítico. Debe ser estable y soluble antes y después de la degradación, requiere ser barato, seguro y fácil de usar. Se emplean sustratos cromogénicos que son incoloros inicialmente y fuertemente coloreados después de la degradación. En algunos casos se emplean sustratos fluorogénicos que dan un producto fluorescente, y tienen la ventaja de proporcionar un análisis de alta sensibilidad, como es el caso de la metilumbeliferina (5).

Un sustrato adecuado para la fosfatasa alcalina, es el fosfato de p-nitrofenol. Para la peroxidasa se emplean la o-toluidina y la o-fenilendiamina, que es el sustrato más adecuado (9).

Con objeto de detener la reacción, se emplea generalmente NaOH, aunque se usan también H_2SO_4 , formalina, NaN_3 , H_2O_2 y etanol absoluto, entre otros reactivos, de acuerdo al sustrato empleado (2).

El resultado de una prueba de ELISA, puede determinarse visualmente o por medición fotométrica.

Cuando se realiza una lectura visual, el resultado puede reportarse como positivo o negativo. Para análisis que requieren una alta precisión, el resultado debe leerse fotométricamente. Los resultados obtenidos pueden reportarse de las siguientes formas (9):

1. Como positivas o negativas de acuerdo a un nivel determinado previamente con muestras negativas.
2. Como un valor de absorbancia bajo condiciones definidas, incluyendo muestras de referencia.
3. Como un cociente del valor de absorbancia de la muestra, entre un grupo de muestras negativas conocidas.

4. Como punto final de la titulación, al realizar diluciones seriadas de la muestra, y probarlas por ELISA.

5. Como una unidad, elaborando una curva patrón con muestras conocidas.

Las ventajas del ELISA incluyen bajo costo, estabilidad de los reactivos, seguridad, sensibilidad, rapidez, una manipulación simple, especificidad, equipo de fácil acceso, la posibilidad de realizar múltiples análisis simultáneamente, permite automatización y no representa peligros de radiación (10). Detecta rangos de nanogramos/ml (4).

La técnica de ELISA se encuentra en una etapa inicial de desarrollo, pero esta logrando mucha popularidad e interés. Deben evaluarse todavía muchas variables (2).

Es de suma importancia definir los conjugados enzima-anticuerpo, en términos de la actividad enzimática y de las propiedades inmunológicas, como son las especificidades y afinidades de los anticuerpos; los sustratos deben compararse rigurosamente con materiales de referencia (7).

Se puede obtener reacciones falsas positivas por la presencia de factores no específicos en el suero, que se unen a componentes de la preparación cruda de antígenos (5).

Inicialmente, este inmunoanálisis se utilizó principalmente en el área de enfermedades infecciosas (9).

Se han estudiado anticuerpos frente a bacterias como Salmonella, Vibrio cholerae, Escherichia coli, Brucella abortus, Yersinia enterocolitica, Neisseria gonorrhoeae, Neisseria meningitidis, Klebsiella pneumoniae, Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium leprae y Chlamidiae. Se han determinado antígenos de Streptococcus pneumoniae, de Haemophilus influenzae, de Neisseria meningitidis, y los antígenos "O" de Brucella y Salmonella. El ELISA ha permitido medir la respuesta humoral a la vacunación de difteria y tétanos; se han me

dido también las enterotoxinas estafilococcicas y el *Treponema pallidum* (9).

En micología esta técnica se ha utilizado para determinar anticuerpos frente a *Aspergillus* y *Candida*; se ha aplicado en el diagnóstico de micetoma y para determinar aflatoxina B (9).

El ELISA se empieza a usar en el inmunodiagnóstico de enfermedades virales, y ya se han realizado estudios para virus de rubeola, citomegalovirus, grupo herpes, rotavirus, virus de la influenza A y B, virus sincitial respiratorio, virus de la parainfluenza, adenovirus, virus de varicella-zoster, virus del sarampión, arbovirus, virus de la hepatitis B y otros (1).

Se han desarrollado estudios de enfermedades parasitarias tales como la malaria, la esquistosomiasis, la leishmaniasis, la toxoplasmosis, la amibiasis invasiva, la oncocercosis, la enfermedad del quiste hidatiforme, la equinococosis alveolar, la triquinosis y la toxocariasis (6).

En el área de hormonas, se ha aplicado el ELISA en la determinación de gonadotropina coriónica, el lactógeno placentar humano, la insulina, las hormonas tiroideas y los estrógenos entre otras (10).

Esta técnica se ha empleado en la detección de drogas tales como el metrotexato, la digoxina y drogas antiepilépticas (9).

Se han estudiado por el ELISA, componentes del suero, con son los anticuerpos IgG, IgM e IgE, la ferritina, La α_2 haptoglobina, el factor VIII, el fibrinógeno y otros (5). También se han medido los niveles de proteínas oncofetales, como es el caso de la α -fetoproteína y del antígeno carcino-embriogénico (10).

En el campo de las enfermedades autoinmunes, ha sido utilizado el ELISA en la medición de complejos inmunes del factor reumatoide, anticuerpos anti-actina y otros (8).

Otras aplicaciones del ELISA se han desarrollado en el área veterinaria y agrícola (9). En veterinaria se han estudiado por este método la tuberculosis, triquinosis, brucelosis, cisticercosis, enfermedad del virus de Newcastle, tripanosomiasis y otras enfermedades (6). En el campo agrícola se han analizado gran cantidad de virus, como son el virus mosaico de la manzana y el pepino, virus de la papa A y Y, y muchos otros (1).

Se espera que en un futuro próximo, el ELISA se utilizará para investigar también alimentos contaminados por toxinas y contaminación ambiental (9).

CUESTIONARIO

1. ¿Cómo puede separarse la fracción inmunoglobulina del antisuero, con objeto de utilizarla en el ELISA?
2. Explique como se efectúa la unión, en la preparación de un conjugado.
3. ¿Cómo debe realizarse la determinación de la fuerza del conjugado?
4. ¿Qué variables de la fase sólida deben ser evaluadas?
5. Describa el procedimiento que debe seguirse para evitar que ciertos materiales presentes en la muestra se adhieran a la fase sólida en forma inespecífica.
6. Mencione dos sustratos sobre los cuales actúa la enzima peroxidasa.
7. ¿Qué parámetros críticos deben vigilarse en la realización del ELISA?
8. Esquematice la técnica del método competitivo para antígeno del ELISA.
9. ¿Qué ventajas presenta el ELISA en comparación con el radioinmunoanálisis?
10. ¿Cuál es la importancia de la aplicación del ELISA en el campo agrícola?

BIBLIOGRAFIA

1. Bidwell E. B., Bartlett A. y Voller A. Enzyme Immunoassays for Viral Diseases. The J. Infect. Dis.,136:274,1977.
2. Bullock L. S y Walls W. K. Evaluation of Some Parameters of the Enzyme-Linked Immunospecific Assay. The J. Infect. Dis.,279:1977.
3. Engvall E. y Perlmann P. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ELISA. The J. Immun.,109(1),1972.
4. Gilman C. S. y Docherty J. J. Detection of Antibodies Specific for Herpes Simplex Virus in Human sera by the Enzyme-Linked Immunosorbent Assay. The J. Infect. Dis.,136:286, 1977.
5. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.
6. Ruitenberg J. E. y Van Knapen F. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay and Its Application to Parasitic Infections. The J. Infect. Dis.,136:267, 1977.
7. Saunders C. G. y col. Application of Indirect Enzyme Labeled Antibody Microtest to the detection and Surveillance of Animal Diseases. The J. Infect. Dis.,136:258,1977.
8. Shuurs A. H. W. M. y Van Weemen K. B. Enzyme-Immunoassay: A Powerful Analytical Tool. J. Immunoassay,1(2):229,1980.
9. Voller A., Bidwell E. D. y Bartlett A. The Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). A guide with Abstracts of Microplate Applications. 1a. edición. Great Britain. Ed. Dynatech Laboratories Inc. 1979.
10. Wisdom G. B. Enzyme-Immunoassay. Clin. Chem.,22(8): 1243, 1976.

ORGANIZACION DE UN LABORATORIO DE INMUNOLOGIA CLINICA

El campo de la inmunología ha progresado notablemente durante los últimos años, y se han efectuado avances significativos, no sólo en la comprensión de los mecanismos básicos de la respuesta inmune, sino también en sus aplicaciones en la práctica médica.

Históricamente hablando, las aplicaciones de la inmunología a nivel de laboratorio, se desarrollaron inicialmente en las áreas de serología de la enfermedades infecciosas y más tarde, en el banco de sangre. En años recientes, este campo se ha ampliado notablemente y sus implicaciones prácticas, ahora se extienden a varias áreas clínicas que incluyen: reumatología, dermatología, nefrología, enfermedades alérgicas y de hipersensibilidad, cardiología, neurología, pediatría, gastroenterología, y finalmente otros dos campos mayores que son: trasplantes e inmunología del cáncer. Los laboratorios clínicos, se enfrentan con problemas crecientes para proporcionar servicio en las áreas antes mencionadas, ya que ha aumentado el número de pruebas de laboratorio, para el diagnóstico y manejo de enfermedades clínicas con implicaciones inmunológicas. El crecimiento de esta área, está dando lugar a la aparición de un grupo de científicos y técnicos de laboratorio, con interés primordial en las pruebas inmunológicas. Por ahora, estos individuos y las pruebas inmunológicas se encuentran en muy diferentes laboratorios clínicos, como son el de microbiología, serología, banco de -- sangre, hematología, química clínica e histopatología. Se está tratando ahora entre los centros médicos, de crear un laboratorio bien definido de inmunología clínica, por lo cual se requiere desarrollar ciertos lineamientos para su organización.

ORGANIZACION PROPUESTA

Las pruebas generalmente consideradas, en el laboratorio de inmunología clínica, incluyen varias técnicas de inmunoprecipitación, inmunomicroscopía, técnicas de aglutinación, pruebas para proteínas séricas, incluyendo los componentes del complemento, pruebas de histocompatibilidad o tipificación de tejidos, pruebas para la inmunidad celular y procedimientos que utilizan materiales radioactivos. Las áreas de un laboratorio de Inmunología, pueden ser divididas en la siguiente forma:

- a). Area de Inmunología General.
- b). Area de Inmunología Celular.
- c). Area de Pruebas de Histocompatibilidad o Tipificación de Tejidos.
- d). Area de Trabajo con Material Radioactivo.

Posiblemente, la más importante consideración en el manejo de estas áreas, está relacionada con el control de calidad, que incluiría la calidad de los reactivos e instrumentos, la selección del procedimiento para determinada prueba, especímenes de control positivos y negativos, estándares, colección y conservación de muestras, procedimientos de seguridad, procesamiento de datos, interpretación y reporte, distribución de las áreas de trabajo, y contabilidad de costos.

AREA DE INMUNOLOGIA GENERAL

Esta área, debe ser designada para realizar pruebas tales como son las técnicas de inmunoprecipitación, inmunomicroscopía comprendiendo reactivos fluorescentes y enzimas - marcadas, análisis de proteínas séricas, incluyendo aquellas para los componentes del complemento, y las pruebas y procedimientos de aglutinación. El espacio, equipo y personal de esta unidad, va a depender de las necesidades de determinada institución.

En esta área pueden realizarse otras pruebas serológicas, para diagnosticar enfermedades infecciosas y no infecciosas. Entre las más comunes están aquellas relacionadas con la detección de anticuerpos circulantes en varias enfermedades autoinmunes.

La prueba de inmunofluorescencia indirecta, se incluye para varios anticuerpos antinucleares, anticuerpos mitocondriales, anticuerpos de músculo liso, anticuerpos localizados en la membrana basal de la piel, y varios otros autoanticuerpos.

Las pruebas de inmunofluorescencia directa, se realizan en biopsias de tejidos, y son importantes en el estudio de enfermedades renales, de hígado y de piel.

Las técnicas de inmunoprecipitación, incluyen la determinación de inmunoglobulinas en suero, determinación de los componentes del complemento, medición de varias proteínas séricas como son la ceruloplasmina, la α 1-antritripsina, la proteína C reactiva y muchas otras. Las técnicas nefelométricas están reemplazando gradualmente las técnicas de inmunodifusión radial; en muchos laboratorios clínicos, los procedimientos inmunoelectroforéticos se realizan principalmente para caracterizar las gamopatías monoclonales.

Un prototipo de las técnicas de aglutinación, es la -- prueba de aglutinación con eritrocitos tanados, para los anticuerpos frente a tiroglobulina y los anticuerpos microsomales.

AREA DE INMUNOLOGIA CELULAR (UNIDAD DE CULTIVO DE TEJIDOS)

En el área de Inmunología Celular, se realizan pruebas relacionadas con la evaluación de la inmunidad mediada por células. Incluye la prueba de la transformación blastoide del linfocito con mitógenos y antígenos apropiados, la -- prueba de inhibición del factor de migración, cuantificación de células T y B en sangre periférica y en tejidos linfoides, pruebas "in vitro" para estudios de la citotoxicidad del lin

focito contra varias células blanco, pruebas de la quimotaxis del monocito, y otros procedimientos tales como la prueba de inhibición de la adherencia del leucocito evaluada en la detección de inmunidad humoral, y las pruebas de rosetas para identificar marcadores característicos de los linfocitos, y poderlos separar para investigaciones posteriores.

Esta área requiere de un cuarto de esterilidad adecuado para el cultivo de tejidos involucrados en el trabajo.

Para evitar peligros de contaminación, este cuarto debe tener algún sistema como sería la luz U.V. sobrecalentada, un sistema de presión de aire positivo con filtros adecuados y flujo laminar. Debe tener también, incubadoras de cultivos, y otro equipo estándar para esas operaciones. - - Idealmente, el área de cultivo de tejidos, debería dividirse en dos partes: una para estricto trabajo estéril y otra para realizar cultivos rápidos, preparar reactivos y procesar muestras para evaluaciones finales, que no requieren esterilidad rigurosa.

El estudio de la Inmunidad Celular es importante en la evaluación de pacientes con deficiencias primarias o secundarias, con enfermedades autoinmunes, con síndromes de hipersensibilidad retardada, con enfermedades malignas, especialmente en aquellos que siguen un programa de inmunoterapia y pacientes con transplantes, cuya inmunosupresión debe ser monitoreada.

AREA DE PRUEBAS DE HISTOCOMPATIBILIDAD O TIPIFICACION DE TEJIDOS.

Las pruebas de histocompatibilidad, son un servicio de tipo especializado esencial para instituciones que llevan a cabo programas de transplantes. Otro importante campo de actividad para esta área del laboratorio, es el estudio de asociaciones de enfermedades que se están investigando actual-

mente. Por ejemplo, se ha establecido que en el caso de espondilitis anquilosante, existe asociación con HLA-B27, y es esta una prueba comunmente solicitada.

Otra importante aplicación de la prueba de antígeno de linfocitos, se encuentra en el campo de las pruebas de paternidad. En años próximos, esta será definitivamente importante aplicación de las pruebas de histocompatibilidad.

AREA DE TRABAJO CON MATERIAL RADIOACTIVO

Los análisis que utilizan material radioactivos, tales como el radioinmunoanálisis para varias hormonas y otras sustancias, como el antígeno de la hepatitis B, la inmunoglobulina E, el antígeno carcinoembrionogénico, la α -fetoproteína y muchas otras, representan un área de rápido crecimiento en el laboratorio clínico.

En muchas instituciones, estas técnicas se realizan en varios departamentos de laboratorios clínicos que incluyen endocrinología, química clínica y radiología. Como estas técnicas son esencialmente inmunológicas por las reacciones antígeno-anticuerpo que involucran, se deben considerar como parte integral del laboratorio de Inmunología. Por ser estas técnicas reproducibles, muy sensibles, específicas y permiten el análisis de un gran número de muestras, están reemplazando los bioanálisis normalmente empleados. Actualmente se han automatizado varias técnicas de radioinmunoanálisis y es posible conseguir el equipo necesario para efectuar dichas determinaciones.

En años recientes, se han desarrollado inmunoanálisis con enzimas marcadas para la determinación de varias sustancias, y actualmente se están estableciendo para reemplazar parte de los radioinmunoanálisis a nivel de un laboratorio clínico.

CONTROL DE CALIDAD

Cada laboratorio de Inmunología, debe en cualquier momento estar capacitado para demostrar y documentar su habilidad en la realización de las pruebas que proporciona como servicio de laboratorio clínico. Se sugiere, que aproximadamente un 20 a 25% del esfuerzo total del laboratorio, debe estar dirigido a realizar pruebas de control de calidad, de especímenes, tales como los estándares, controles positivos y negativos.

En la segunda Conferencia de Pruebas de Control de Calidad, llevada a cabo por el Consejo Nacional de Servicios de Laboratorios de la Salud, se delinearon algunas características del laboratorio de inmunología clínica, que afectan directamente el control de calidad. Estas incluyen:

1. Inaccesibilidad de estándares físicos requeridos para la mayoría de las prácticas en este campo.
2. Muchos de los datos generados por estas pruebas, son cuantitativos y no dimensionales.
3. La marcada necesidad de educación para entender y aplicar los datos obtenidos por estas pruebas, especialmente a nivel clínico.
4. El amplio rango de diversidad en esta área, que se extiende desde las pruebas serológicas de la sífilis, hasta estudios funcionales de células T y B.

El control de calidad en el laboratorio de inmunología - sirve no solamente para conocer requerimientos regulatorios, sino también como herramienta de educación.

BIBLIOGRAFIA

1. Deodhar, S.A. y col. Immunology. 1a. edición. U.S.A. Ed. S. L. Inhorn. 1978
2. Rose R. N. y Friedman H. Manual of Clinical Immunology. 2a. edición. U.S.A. Ed. American Society for Microbiology. 1980.

EQUIPO MINIMO REQUERIDO EN UN LABORATORIO
DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA.

Baño a Temperatura Constante.

Cámara de Electroforesis.

Fuente de Poder de Corriente Estabilizada (6mA y 100-200
Volts).

Centrífuga (hasta 4 000 rpm).

Colorímetro Coleman Jr.

Estufa con Temperatura Constante.

Microscopio de Luz (con objetivos de 10X, 40X y 100X).

ABREVIATURAS UTILIZADAS EN EL MANUAL.

Ac.	Anticuerpo.
Ag.	Antígeno
C'.	Complemento.
CFA.	Células formadoras de anticuerpos.
C'H50.	Complemento total 50% hemolítico.
CIEF.	Contrainmunolectroforesis.
E.	Receptores para eritrocitos de borrego en los linfocitos T.
EAC.	Receptores para el complemento en los linfocitos B.
EIA.	Enzimoimmunoanálisis.
EID.	Electroimmunodifusión.
ELISA.	Análisis utilizando inmunoabsorbente y enzima unida.
FAN	Factores anti-nucleares.
GRC.	Eritrocitos de carnero.
IF.	Inmunofluorescencia.
Ig.	Inmunoglobulina.
MEM.	Medio mínimo esencial de Eagle.
Ml.	Mononucleosis infecciosa.
NAT.	Nitroazul de tetrazolio.
NT.	Núcleos de timo.
RIA.	Radioimmunoanálisis.
TBS.	Solución amortiguadora de trietanolamina salina.
WHO.	Organización Mundial de la Salud.