



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

Química Farmacéutico Biológica

Área Bioquímica Clínica

Manual de Laboratorio de Inmunología Clínica

APROBADO POR EL COMITÉ ACADEMICO DE CARRERA

6 de marzo de 2020



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	1 /108

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA

Autores primera versión:

Rubén Marroquín Seguro.

Maurilio Flores Pimentel.

Autores versión actual:

Rubén Marroquín Seguro.

Maurilio Flores Pimentel.

Oswaldo Daniel Castelán Martínez

Martha Legorreta Herrera

Adriana Gutiérrez Hoya

María de las Mercedes Zamudio Duran

Omar Fernández Rivera

Revisores:

Adriana Gutiérrez Hoya.

Oswaldo Daniel Castelán Martínez.

María de las Mercedes Zamudio Durán.

Francisco Javier Parada García.

Jesús Aguilar Castro.

Luis Antonio Cervantes Candelas.

Omar Fernández Rivera.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	2 /108

Índice

Introducción al manual del Laboratorio de Inmunología Clínica -----	4
Objetivos de manual del Laboratorio de Inmunología Clínica -----	5
Contenido -----	6
Práctica 1. Fagocitosis -----	6
Práctica 2. Células formadoras de anticuerpo -----	15
Práctica 3. Obtención y purificación de gammaglobulina humana -----	19
Práctica 4. Complemento-----	23
Práctica 5. Reacciones de inmunoprecipitación -----	28
Práctica 6. Reacciones de aglutinación-----	38
Práctica 7. Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas -----	48
Práctica 8. Factor inhibidor de la migración de los leucocitos (LIF) e intradermoreacciones -----	55
Práctica 9. Antiestreptolisinas -----	60
Práctica 10. Cuantificación de linfocitos-----	65
Práctica 11. Tipificación de subpoblaciones de linfocitos y células de la respuesta inmune por citometría de flujo. -----	72
Práctica 12. Inmunocromatografía diagnóstica -----	88
Criterios de evaluación -----	94
Reglamento del laboratorio -----	98
Anexos -----	99
Anexo 1. Soluciones -----	99
Solución salina 0.85% -----	99
Preparación del sulfato de amonio saturado -----	99



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	3 /108

Solución salina amortiguada pH 7.4 (SSA)-----	99
Solución Alsever-----	100
Solución reguladora de TBS: (Triethanolamine Buffered Saline)-----	100
Solución de Hanks-----	101
Solución PBS (Buffer salina fosfatos)-----	101
Solución PBS-Tween -----	101
Solución amortiguador de recubrimiento. Carbonato-bicarbonato pH 9.6-----	102
Solución de sustrato de peroxidasa de rábano picante -----	102
Solución de bloqueo para ELISA -----	102
Solución salina citratada-----	102
Solución MEM (medio esencial mínimo)-----	103
Solución de Krebs-Henseleit, pH 7.4-----	103
Anexo 2. Papel semilogarítmico de tres ciclos.-----	104
Anexo 3. Nomograma para convertir revoluciones por minuto a gravedades.-----	105
Anexo 4. Lista de materiales necesarios por equipo.-----	106
Anexo 5 Manejo de residuos.-----	107
Anexo 6. Identificación de residuos químicos. -----	108



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	4 /108

Introducción al manual del Laboratorio de Inmunología Clínica

La defensa exitosa de un organismo contra un agente extraño potencialmente nocivo implica un estado de inmunidad. De este modo, la presencia de un agente extraño estimula en el huésped mecanismos de protección que en sentido amplio representa la respuesta inmune. Así, los distintos elementos que conforman los sistemas inmunes surgieron y se perfeccionaron a lo largo de la evolución, por ejemplo, algunos tipos de hongos desarrollaron antibióticos naturales como la penicilina para defenderse de las bacterias, mientras que, estas últimas desarrollaron enzimas, como las β -lactamasas, para inactivar a los antibióticos.

En los seres humanos, el sistema inmune se ha dividido en dos tipos: el innato y el adaptativo. El sistema innato, tiene como función la respuesta inmediata ante un agente extraño y está constituido por reactantes de fase aguda, enzimas como la lisozima y lactoferrina, las colectinas, la cascada del complemento, el interferón gamma, células fagocíticas, por mencionar algunos. Entretanto, en el sistema adaptativo, la respuesta no es inmediata e incluye la formación de anticuerpos específicos al antígeno inductor, además de generar linfocitos sensibilizados. Ambos sistemas, han alcanzado tal grado de sofisticación que cuando alguno de sus elementos falla genera enfermedad. En algunas patologías, algún componente del sistema inmune se exagera y da como resultado enfermedades de tipo autoinmunes, alérgicas, reacciones citotóxicas y citolíticas, etc. En contraste, existen patologías como las inmunodeficiencias que tienen su origen en la disminución o ausencia de alguna parte del sistema inmune.

En el presente manual, se introduce al alumno a metodologías que evalúan tanto mecanismos innatos como adaptativos de la respuesta inmune, así como a su aplicación tanto en el diagnóstico clínico como en la investigación biomédica.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	5 /108

Objetivos de manual del Laboratorio de Inmunología Clínica

- Comprender los fundamentos y realizar pruebas inmunológicas utilizadas en el diagnóstico clínico de enfermedades inmunológicas e infecciosas.
- Comprender los fundamentos y realizar pruebas inmunológicas utilizadas para evaluar el sistema inmune innato.
- Comprender los fundamentos y realizar pruebas inmunológicas utilizadas para evaluar el sistema inmune adaptativo.
- Consolidar los conocimientos adquiridos en la parte teórica del módulo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	6 /108

Contenido

Práctica 1. Fagocitosis

Objetivo

Valorar la inmunidad celular mediante la determinación de la capacidad de adherencia, fagocitosis y microbicida de fagocitos profesionales obtenidos de sangre periférica.

Fundamentación teórica

Son 2 los tipos de fagocitos profesionales: los polimorfonucleares neutrófilos y los fagocitos mononucleares. Existen otras células que bajo ciertas circunstancias pueden también fagocitar v.g. los fibroblastos, células endoteliales etc. Los polimorfonucleares neutrófilos son células terminales, pues en circulación duran alrededor de 8 horas y después mueren, tienen todo su arsenal enzimático preparado y son muy eficientes destruyendo gérmenes de tipo extracelular; pero son ineficientes destruyendo gérmenes intracelulares. Por otro lado, los fagocitos mononucleares, reciben diferentes nombres dependiendo de donde se encuentren: en médula ósea y sangre se llaman monocitos, en hígado células de Kupffer, en hueso osteoclastos, en sistema nervioso células microgliales, en articulaciones células sinoviales tipo A, en tejidos histiocitos o macrófagos, en alvéolos macrófagos alveolares, en peritoneo macrófagos peritoneales, en piel células de Langerhans y en granulomas células gigantes de Langhans (se presentan como células multinucleadas, como un resultado de fusión de macrófagos o bien debido a una deficiencia de disyunción durante la mitosis). Todas estas células, a diferencia de los polimorfonucleares, no están preparadas para fagocitar con eficiencia, necesitan de su activación mediante citocinas como el interferón γ , que actúa transformándolos en células activadas, que se vuelven muy eficientes destruyendo inespecíficamente aún a los gérmenes de tipo intracelular.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	7 /108

Los pasos de la fagocitosis los podemos dividir en: quimiotaxis, endocitosis o adherencia, ingestión, digestión o citopepsis y exocitosis. Existen varias pruebas o procedimientos para evaluar las diferentes etapas de la fagocitosis.

Adherencia

Material y reactivos

Glóbulos rojos de carnero en solución de Alsever.

Gradiente polymorphoprep.

Heparina.

Jeringas de 5 mL.

Pipetas Pasteur.

Porta objetos y cubre objetos.

Solución salina amortiguada.

Tubos de 13 x 100 mm.

Tubos siliconizados.

Equipo

Centrífuga clínica.

Incubadora microbiológica.

Microscopio.

Servicios

Energía eléctrica.

Agua.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	8 /108

Procedimiento

Sensibilización de los glóbulos rojos para rosetas Fc.

1. Los glóbulos rojos se lavan 2 veces en salina amortiguada y se ajustan al 2% en solución salina amortiguada.
2. Tome 5 mL de la suspensión y mezcle con 5 mL de hemolisina a una unidad subaglutinante, incube la mezcla a 37 °C durante 20 minutos. Después de la incubación lave los eritrocitos con salina amortiguada 2 veces por centrifugación a 2500 rpm durante 5 minutos y ajústelos al 1%.
3. Obtenga 5 mL de sangre venosa por punción, con una jeringa con 50U de heparina. La sangre se diluye al doble, en solución salina amortiguada y con la ayuda de una pipeta Pasteur se coloca suavemente 1.25 mL de sangre diluida, en un tubo de 13 x 100 mm, el cual tiene 1.25 mL de polymorphoprep se centrifuga a 500g por 30 minutos a una temperatura de 18 a 22°C.
4. Se observarán 2 bandas en la interfase del gradiente y la solución salina, la banda inferior es la que contiene los polimorfonucleares, los cuales se obtendrán con la ayuda de una pipeta Pasteur.
5. Las células se lavan 2 veces a 2000 rpm durante 5 minutos, en tubos siliconizados se cuentan y se ajustan a 4×10^6 células por mililitro.
6. Mezcle 0.25 mL de la suspensión de glóbulos rojos sensibilizados, con 0.25 mL de células fagocíticas, en un tubo de Khan siliconizado e incube por 20 minutos a 37 °C.
7. Después de la incubación centrifugue el tubo a 1000 rpm por un minuto, resuspenda suavemente; con una pipeta Pasteur. Deposite una gota entre porta y cubreobjetos para observar las rosetas.

Resultados

Cuantifique el número de rosetas. Tres o más eritrocitos adheridos a un fagocito se considera una roseta.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	9 /108

Índice fagocítico

Material y reactivos

Aceite de inmersión.

Cepa de *Candida albicans*.

Gradiente polymorphoprep.

Jeringa de 10 mL.

Metanol.

Nefelómetro de MacFarland.

Pipetas Pasteur.

Pipetas de 1 y 5 mL.

Portaobjetos y cubre objetos.

Solución salina.

Solución salina amortiguada.

Suero fresco humano.

Tinción de Giemsa o Wright.

Tubos de 13 X 100 mm.

Tubos siliconados de Kanh.

Equipos

Centrífuga clínica.

Incubadora microbiológica.

Microscopio.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	10 /108

Procedimiento

Opsonización de *Candida albicans*.

1. Tome con un asa bacteriológica una colonia de *Candida albicans* y colóquela en un tubo de 13 x 100. Ajústela comparando con el tubo número 1 del nefelómetro de MacFarland, use solución salina.
2. Tome dos alícuotas de 2.5 mL de la suspensión y lave las levaduras 2 veces por centrifugación a 5000 rpm por 10 minutos.
3. Resuspenda un paquete de levaduras en 2.5 mL de suero humano fresco (levaduras opsonizadas). El otro paquete resuspendalo en 2.5 mL de solución salina (levaduras sin opsonizar).
3. Mezcle bien e incube por 20 minutos a 37 °C.
4. Después de esta incubación lave por centrifugación a 5000 rpm durante 10 minutos y resuspenda en salina amortiguada.

Los fagocitos polimorfonucleares neutrófilos se obtienen igual que en la práctica de adherencia.

5. Coloque 0.25 mL de células fagocíticas con 0.25 mL de levaduras opsonizadas, en un tubo siliconizado de Kahn e incube 20 minutos a 37 °C.
6. En otro tubo siliconizado, coloque 0.25 células fagocíticas con 0.25 mL de levaduras no opsonizadas e incube 20 minutos a 37 °C.
7. Centrifugue ambos tubos a 1000 rpm por 1 minuto y con una pipeta Pasteur deseche la mitad del sobrenadante y el sedimento se resuspende suavemente con el dedo.
7. Tome varias gotas y colóquelas en un portaobjetos, fíjelas con metanol y tíñalas con colorante de Giemas o Wright.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	11 /108

8. Las preparaciones se leen con objetivo de inmersión.

Resultados

Calcule el índice fagocítico utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Índice fagocítico} = \frac{\text{Número de polimorfonucleares fagocíticos} * \text{Promedio de partículas fagocitadas}}{\text{Número de polimorfonucleares contados}}$$

Actividad bactericida

Material y reactivos

Gradiente de polymorphoprep (Nycomed).

HCl al 2.5N.

KCN 0.01M.

Piridina o ciclohexano.

Solución de Krebs Henseleit.

Solución de NBT al 0.1%.

Tubos de 13X100 mm siliconizados.

Zymosan A opsonizado.

Equipos

Baño metabólico.

Centrifuga clínica.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	12 /108

Procedimiento

1. Obtenga 5 mL de sangre por punción venosa utilizando heparina como anticoagulante.
2. Estratifique 2.5 mL de sangre sobre 2.5 mL de polymorphoprep en un tubo de 13 x 100 mm y centrifugue a 1500 rpm durante 30 minutos.
3. Con la ayuda de una pipeta Pasteur obtenga el anillo de polimorfonucleares y colóquelo en un tubo siliconizado, ajustando la suspensión celular a $20 \times 10^6/\text{mL}$ (aproximadamente un volumen de 0.5 mL), en solución de Krebs-Henseleit.
4. Oponización del zymosan: pese 10 mg de zymosan A y resuspéndalo en 5 mL de agua destilada, centrifugue a 2000 rpm durante 5 minutos. El sedimento se resuspende en 1 mL de suero fresco, se incuba a 37°C durante 20 minutos. Centrifugar a 2000 rpm durante 5 minutos, el sedimento se resuspende en 5 mL de Krebs-Henseleit, centrifugue a 2000 rpm y resuspenda en 1 mL de solución de Krebs-Henseleit.
5. Se marcan por duplicado los tubos siliconizados como en reposo y fagocitando.
6. Los tubos en reposo se les adiciona 0.4 mL y a los fagocitando con 0.35 mL de la solución de Krebs-Henseleit.
7. Coloque 50 μL de zymosan opsonizado a los tubos fagocitando.
8. Adicione 0.1 mL de KCN al 0.01M a todos los tubos.
9. Adicione 0.4 mL de NBT al 0.1% en salina.
10. Preincube los tubos a 37°C por 15 minutos y sin sacar los tubos del baño metabólico.
11. Adicione 0.1 mL de la suspensión celular a todos los tubos.
12. Incube a 37°C durante 15 minutos.
13. Detenga la reacción de todos los tubos con 2 mL de HCl 2.5N.
14. Centrifugue a 2000 rpm durante 15 minutos y al sedimento se adicione 4 mL de piridina y extraiga el formazán por 20 minutos en un baño de agua hirviendo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	13 /108

15. Centrifugue a 2000 rpm durante 15 minutos y vacíe en tubos limpios, enfríe y lea a 515 nm, contra un blanco de piridina.

Resultados

Cuantificar la reducción del NBT.

Manejo de los residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.
- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 4 al 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.4 al 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Puntos guía de estudio.

- Explicar el fenómeno de fagocitosis en sus diferentes etapas.
- Elementos celulares que la realizan.
- Mecanismos antimicrobianos y de destrucción que poseen las células fagocíticas.
- Fundamento de las técnicas: NBT e índice fagocítico.
- Utilidad clínica de estas determinaciones y en qué enfermedades se encuentran alteradas.
- Pruebas de laboratorio para evaluar las diferentes fases de la fagocitosis.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	14 /108

Referencias bibliográficas

1. Beyer LL, Baehner RL. Neutropenia. Neutrophil dysfunction. Neutrophil transport and preparation. Bactericidal killing. NBT slide test. Chemotaxis. Neutrophil CD11b/18 expression: monoclonal double-stain procedure for Mo-1. En: Rose NR *et al* (editors). Manual of clinical laboratory immunology. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 2002.
2. Stossel TP. Phagocytosis: Recognition and ingestion. *Semin Hematol*. 1975; 12(1):83-116.
3. Shi Y, Kornosvsky S, Savani R, Turley EA. A rapid multiwell colorimetric assay for chemotaxis. *J. Immunol Methods*. 1993; 164(2):149-154.
4. Fearon D T, Kaneko I, Thomson GG. Membrane distribution and adsorptive endocytosis by C3b receptors on human polymorphonuclear leukocytes. *J Exp Med*; 1981; 153(6):1615-28.
5. Rhodes J, Bishop M, Bentfield J. Tumor surveillance: How tumors may resist macrophages mediated host defense. *Science*. 1979; 203(4376):179-82.
6. Beyer LL, Baehner RL. Neutropenia. Neutrophil dysfunction. Neutrophil transport and preparation. Bactericidal killing. NBT slide test. Chemotaxis. Neutrophil CD11b/18 expression: Monoclonal double-stain procedure for Mo-1. En: Rose NR *et al* (editors) manual of clinical laboratory immunology. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 2002.
7. Baehner RL, Nathan DG. Quantitative nitroblue tetrazolium test in chronic granulomatous disease. *N Engl J Med*. 1968; 278(18):971-6.
8. Curnutte JT, Berkow RL, Roberts RL, Shurin SB, Scott PJ. Chronic granulomatous disease due to a defect in the cytosolic factor required for nicotinamide adenine dinucleotide phiosphate oxidase activation. *J. Clin Invest*. 1988; 81(2):606-10.
9. Nathan CF. Secretary products of macrophages. *J. Clin Invest* 1987; 79(2):319-26.
10. Malech RGQ, Gallin GL. Current concepts immunology. Neutrophils in human disease. *N Engl J Med*. 1987; 317(11):687-94.
11. Hartgers FC, Figdor CG, Adema GJ. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol Today*. 2000; 21(11):542-5.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	15 /108

Práctica 2. Células formadoras de anticuerpo

Objetivo

Cuantificar células formadoras de anticuerpo mediante la técnica de Jerne.

Fundamento teórico

Esta técnica está basada en una hemólisis localizada, inicialmente solo se podía aplicar a medir respuestas anti glóbulos rojos (no nucleados) y solamente se detectaban aquellas células que producían anticuerpos fijadores de complemento (Jerne y Nordin); pero existen una serie de modificaciones que han ampliado su uso, por ejemplo, medir respuesta a antígenos solubles (Golub, Mishell, Weigle y Dutton), respuesta a bacterias (Barington Heilmann), detección de células productoras de anticuerpo no fijador de complemento, usando un anticuerpo facilitador (Stherl y Riha, Nossal, Warner, Lewis) y medir la hemólisis usando un lector de ELISA (Poduval).

Material y reactivos

Agarosa al 0.6%.

2 cajas Petri de 50 mm.

1 caja Petri de 100 mm.

Colador de malla fina.

Estuche de disección.

Glóbulos rojos de carnero al 10%.

Gradilla.

Jeringas de 1 mL.

Medio mínimo esencial de Eagle (MEM).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	16 /108

Olla de presión.

Pipetas graduadas de 5 mL.

Pipetas Pasteur.

Pipetas automáticas de 0.1 mL y de 0.2 mL.

Ratones CD1.

Suero de cobayo, como fuente de complemento.

Tripié.

6 tubos de 13x100 mm en buen estado.

Equipos

Agitador vórtex.

Baño metabólico.

Incubadora.

Refrigerador.

Servicios

Agua

Energía eléctrica.

Gas.

Procedimiento

1. Inocule los ratones por vía intraperitoneal con 0.2 mL de una suspensión al 10% de glóbulos rojos de carnero, usando una jeringa tipo tuberculina 5 días antes del ensayo.
2. Sacrifique los ratones mediante dislocación cerebral, extraiga el bazo y colóquelo en una caja de Petri de 100 mm que contiene 4 mL de MEM.
3. Separe las células del estroma del bazo, con la ayuda de un colador de malla fina y un tubo de ensayo de 13x100 mm, colecte las células, con la ayuda de una pipeta Pasteur en un tubo,



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	17 /108

deje sedimentar el tejido y transfiera el sobrenadante de células a un segundo tubo, de este último realice diluciones 1:20 y 1:30 en MEM.

4. En paralelo, prepare agarosa a una concentración al 0.6% en MEM y caliéntela en la olla de presión para que se funda. Una vez que saque la agarosa de la olla, manténgala a 45 °C.

5. En un tubo de 13 X 100, mezcle 0.1 mL de la dilución 1:20 de las células con 2 mL de agarosa al 0.6%, en MEM (que se ha mantenido en baño María a 45 °C) y 0.2 mL de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 10%, mezcle rápido en el agitador vórtex y vacíe en una placa de Petri de 50 mm, deje solidificar sin mover.

6. Realice el mismo procedimiento para las células provenientes de la dilución 1:30.

7. Incube las placas a 37 °C por 45 minutos en la incubadora.

8. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, adicione a cada placa 2 mL de complemento de cobayo fresco diluido 1:10 en MEM.

9. Incube las placas a 37 °C por 30 minutos. Una vez cumplido el tiempo deseche el complemento diluido y sustituya por 2 mL de MEM frío para detener la reacción.

10. Cuente el número de células formadoras de placa y realice el cálculo para reportarlas por bazo.

Resultados

Reporte el número de células productoras de anticuerpo; realice el cálculo por bazo. Utilice la siguiente fórmula:

$$\text{CFA por bazo} = \text{Número PL} * 4 * \text{FD} * 10$$

Donde, CFA son las células formadoras de anticuerpo; PL, Placas líticas; FD, factor de dilución.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	18 /108

Manejo de los residuos

- Los cadáveres de animales se depositan en la bolsa amarilla ubicada en el área de confinamiento de residuos.

Puntos guía de estudio.

- Órganos linfoides primarios y secundarios.
- Anatomía y funciones del bazo.
- Tipos de linfocitos.
- Características y diferencias entre los linfocitos B y las células plasmáticas.
- Respuesta inmune humoral.
- Cinética de la respuesta inmune humoral.
- Características de las inmunoglobulinas, actividad biológica.
- Fundamento de la técnica de Jerne. Modificaciones a la técnica de Jerne.
- Otras técnicas empleadas para evaluar a las células formadoras de anticuerpos.

Referencias bibliográficas

1. Jerne NK, Nordin AA. Plaque formation in agar by single antibody producing cells. *Science* 1963; 140(3565):405.
2. Golub ES, Mishell RI, Weigle WO, Dutton RW. A modification of the hemolytic assay for use with protein antigens. *J Immunol.* 1968; 100(1):133-7.
3. Barington T, Heilamnn C. An improved haemolytic plaque assay for the detection of cells secreting antibody to bacterial antigens. *J Immunol Methods.*1992; 146(1):129-37.
4. Stherl J, Riha I. Detection of cell producing 7S antibody by the plaque technique. *Nature* 1965; 208(5013):858-9.
5. Poduval TB. Quantitation of lymphocyte mediated sheep red blood cells hemolysis, using an ELISA reader. *J Immunol Methods.* 1991; 142(1):137-9.
6. Kennedy JC, Till JE, Siminovitch L, McCulloch EA. The proliferative capacity of antigen sensitive precursors of haemolytic plaque forming cells. *J Immunol.* 1966; 96(6):973-80.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	19 /108

Práctica 3. Obtención y purificación de gammaglobulina humana

Objetivo

Precipitar y purificar gammaglobulinas humanas con sulfato de amonio.

Fundamentación teórica

Desde hace más de 100 años, las sales minerales se han usado para precipitar o fraccionar proteínas. Brieger y Ehrlich en 1883, fueron los primeros en precipitar inmunoglobulinas con sulfato de amonio. La precipitación de globulinas se puede llevar a cabo también con sulfato de sodio, alcohol, sulfato de magnesio, entre otros. El sulfato de amonio tiene la ventaja, de que sus soluciones saturadas, contienen grandes cantidades de sal y que su solubilidad se modifica poco con la temperatura, no ocurre lo mismo que con el sulfato de sodio, en donde su solubilidad si se modifica mucho con la temperatura. Con sulfato de amonio, el peligro de desnaturalización de la proteína es bajo, en comparación a el método de precipitación con alcohol, donde si no se adiciona lentamente, lo más común es que ocurra desnaturalización. El fraccionamiento con sulfato de amonio, no requiere el ajuste exacto del pH, como con la precipitación con alcohol. Las desventajas del sulfato de amonio es que, la sal se debe de remover por diálisis y este proceso requiere de 1 a 3 días y se corre el riesgo de contaminación bacteriana y además se recomienda que el sulfato de amonio sea puro; sin contaminantes de metales, ya que estos iones pueden ser unidos firmemente por algunas proteínas y pueden catalizar reacciones de oxidación. La precipitación de la gammaglobulina por este método se basa en el fenómeno de "salting out", que es una deshidratación de la proteína por la sal, de tal manera que las moléculas de agua que recubren a la molécula de anticuerpo son desplazadas por los iones de sulfato, que además neutralizan los grupos cargados de la proteína, la cual alcanza su punto isoeléctrico y precipita.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	20 /108

Material y reactivos

Cloruro de bario.

Dos ligas

Suero humano.

Solución de sulfato de amonio saturada.

Solución salina 0.85%.

Bolsa de diálisis con corte de 10,000 daltons.

Tubos de 13 x 100 mm.

Equipo

Agitador vórtex.

Centrífuga clínica.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento

1. Realice una precipitación del suero al 45 % de saturación de sulfato de amonio, usando la siguiente formula:

$$\text{mL de } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{\text{saturación 2} - \text{saturación 1}}{1 - \text{saturación 2}}$$

$$\text{Ejemplo, mL } (\text{NH}_4)_2\text{SO}_4 = \frac{45 - 100}{1 - 45} = \frac{-55}{-44} = 1.25$$



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	21 /108

Por cada 1.25 mL del suero, se adiciona 1 mililitro de solución saturada de sulfato de amonio. La adición se hace gota a gota con agitación constante y se sigue agitando durante 10 minutos.

2. Centrifugue por 5 minutos a 800g.
3. Retire el sobrenadante y el precipitado se resuspende, en solución salina, a un volumen original de suero.
4. Realice una segunda precipitación al 33%. Después de la adición del sulfato saturado, el precipitado se centrifuga por 5 minutos a 800 g.
5. Retire el sobrenadante, redisuelva el precipitado en 0.5 mL de solución salina y colóquelo en la bolsa de diálisis previamente cerrada con una liga en un extremo.
6. Cierre la bolsa de diálisis con la otra liga, colóquela en un vaso de precipitados y dialice contra solución salina, hasta eliminar el sulfato de amonio.
7. Para comprobar que se eliminó todo el sulfato de amonio, con la solución de diálisis se hace una prueba con cloruro de bario y no debe aparecer ningún precipitado.
8. Para evitar contaminación bacteriana adicione azida de sodio al 0.1%.

Resultados

Obtención de gammaglobulina humana.

Manejo de los residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.
- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	22 /108

alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Puntos guía de estudio.

- Constitución proteica del suero.
- Características y propiedades fisicoquímicas de las gammaglobulinas.
- Métodos de separación de proteínas:
 - métodos específicos,
 - métodos inespecíficos.
- Fundamento de la técnica de precipitación con sulfato de amonio.
- ¿En qué consiste el fenómeno de *salting-out*?
- Factores que afectan la precipitación salina.
- Ventajas y desventajas de la precipitación con sulfato de amonio.
- Utilidad de los productos obtenidos por precipitación con sulfato de amonio.

Referencias bibliográficas.

1. Heide K, Schwick HG. Salt fractionation of immunoglobulins. En Weir DM ed. Handbook of experimental immunology. Immunochemistry. Fourth ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986.
2. Hudson L, Hay FC. Practical immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1980.
3. Campbell DH, Garbey JS, Cremer NE, Sussdorf DH. Methods in immunology: a laboratory text for instruction and research. N. Y: Benjamin, 1964.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	23 /108

Práctica 4. Complemento

Objetivo

Determinar la actividad lítica del complemento en unidades 50% hemolíticas.

Fundamento teórico

La prueba CH50%, como ensayo de complemento hemolítico total, es un método tradicional para la determinación de complemento en suero y otros fluidos biológicos. Se basa en la medición de la capacidad de un suero de prueba para lisar el 50% de una suspensión de eritrocitos de carnero (E), cubiertos con cantidades óptimas de anticuerpos de conejo anti-glóbulos rojos de carnero (A), es una reacción que incluye la activación completa de la vía clásica. Esos eritrocitos cubiertos con anticuerpo EA, se incuban con varias diluciones del suero de prueba, por un tiempo suficiente para completar la reacción. Las mezclas se centrifugan y el porcentaje de hemólisis se determina espectrofotométricamente. Cuando se gráfica el porcentaje de lisis contra la cantidad de suero adicionado, se obtiene una curva típica sigmoide. Los valores en el rango de 10 a 90% se transforman en una recta, graficando sobre papel de probitas o usando la transformación de Von Krogh. El volumen del suero conteniendo 1 unidad CH50% que es el volumen que corresponde a una hemólisis al 50% y se determina, el valor de las unidades por mililitro del suero de prueba sin diluir. Existen 2 métodos muy usados en los laboratorios clínicos: El método de Kent y Fife, mide la lisis de 0.6 mL de una suspensión al 1% de EA en un volumen total de 1.5 mL. El método de Manfred Mayer, mide la lisis de una suspensión de EA al 5% en un volumen total de 7.5 mL. Por supuesto, los límites de referencia de las unidades CH50% de la población clínicamente sana, se deben establecer en cada laboratorio.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	24 /108

Materiales y reactivos

Glóbulos rojos de carnero (GRC) conservados en solución de Alsever.

Hemolisina (2U 50% hemolíticas) en solución de TBS.

Pipetas graduadas de 1 y 5 mL.

Solución amortiguadora de TBS.

Suero a determinar su actividad de complemento.

Solución de TBS.

Tubos de 13 X 100 mm.

Equipo

Baño metabólico.

Centrífuga clínica.

Espectrofotómetro.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento

1. Lave los GRC por centrifugación a 2000 rpm. por 5 minutos, con solución de TBS.
2. Ajuste la suspensión de GRC al 2% en TBS.
3. Coloque en un tubo de 13 x 100 mm, 0.6 mL de la suspensión de GRC al 2%, adicione 3.4 mL de agua destilada. Lea la densidad óptica en un espectro a 550 nm, usando como blanco agua destilada.

Ajuste la densidad óptica a 0.5 con la ecuación.

$$D.O.1 \times V1 = D.O.2 \times V2$$



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	25 /108

4. Adicione un volumen de hemolisina titulada a 2U 50% hemolítica con un volumen igual de la suspensión de GRC e incube 30 minutos a 37 °C en un baño metabólico, con agitación frecuente. La suspensión queda al 1%.

5. Prepare las siguientes diluciones del suero problema:

A. 0.4 mL de suero + 9.6 mL de TBS dilución 1:25

B. 5 mL de la dilución 1:25 + 5 mL de TBS dilución 1:50

C. 5 mL de la dilución 1:50 + 5 mL de TBS dilución 1:100

Deposite en baño de hielo.

6. Introduzca una gradilla en baño de hielo y coloque 12 tubos, 4 para cada dilución más 2 tubos (testigo negativo y testigo positivo). Realice una serie para cada dilución.

tubo	1	2	3	4	test. pos	Test. neg.
dil.de suero	1 mL	0.7 mL	0.5 mL	0.3 mL	0 mL	0 mL
TBS	0.8 mL	1.1 mL	1.3 mL	1.5 mL	0 mL	1.8 mL
GRC 1% sens.	1.2 mL	1.2 mL	1.2 mL	1.2 mL	1.2 mL	1.2 mL

7. Mezcle perfectamente e incube en baño María 30 minutos a 37 °C, agitando frecuentemente.

8. Transcurrido el tiempo de incubación, retire los tubos del baño y adicione 1 mL de TBS frío para detener la reacción, excepto al tubo testigo positivo.

9. Al testigo positivo se le adiciona 2.8 mL de agua destilada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	26 /108

10. Centrifugue los tubos a 2000 rpm. 5 min. y decante el sobrenadante sobre un tubo limpio y lea la densidad óptica a 550 nm usando como blanco el tubo negativo y como 100% de lisis a la lectura del testigo positivo.

Resultados

Grafique sobre papel semilogarítmico de probitas de tres ciclos (anexo 2) y determine las unidades 50% hemolíticas del suero empleado.

Manejo de residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.
- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración del 4 al 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.4 al 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Puntos guía de estudio.

- ¿Qué es el complemento?
- Función biológica.
- Sustancias que activan el sistema del complemento:
 - inmunológicas,
 - no inmunológicas.
- Vías del complemento:
 - clásica,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	27 /108

- alterna,
- lectinas
- Técnica CH50, fundamento y variables.
- Otras técnicas para la evaluación del complemento.

Patologías que involucran alteraciones del sistema del complemento.

Referencias bibliográficas

1. Kent JF, Fife EH. Precise standarization of reagents for complement fixation. *Am J Med Trop.* 1963; 12:103-16.
2. Mayer MM. Complement and complement fixation. En: EA Kabat and MM Mayer (eds) *Experimental immunochemistry*. Charles C Thomas, Publisher, Springfield, III.
3. Ruddy S. Complement background, methods of measurement, clinical indications, interpretation, reagents and test procedures. En NR Rose *et al* (eds). *Manual of clinical laboratory immunology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1992.
4. Parngburn MK. Activation of complement via the alternative pathway. *Fed Proc.* 1983; 42(1):139-43.
5. Morgan BP, Daha MM, Nicholson-Weller A. Into the third century of complement research. *Immunol Today.* 2000; 21(12): 603-5.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	28 /108

Práctica 5. Reacciones de inmunoprecipitación

Objetivo

Demostrar la presencia de sistemas antígeno-anticuerpo por medio de técnicas de inmunoprecipitación.

Fundamento teórico

Cuando una solución de antígeno soluble, es mezclado con su antisuero correspondiente, el antígeno se combina muy rápido con el anticuerpo y si las condiciones son las adecuadas los reactantes forman un precipitado. La velocidad de la reacción de precipitación está influida por factores físicos, químicos e inmunológicos. Por ejemplo, la temperatura comúnmente usada para las reacciones de precipitación, varía de 0 a 56 °C. Así tenemos sistemas de precipitación, en que la precipitación óptima la alcanzamos en frío (crioglobulinas); mientras que otros sistemas el máximo de reacción se presenta a temperaturas elevadas (piroglobulinas). El contenido de electrolitos y el pH juegan un papel muy importante, así tenemos que pH fuera del rango de 6.5 a 8.2 pueden retardar la precipitación o darnos precipitaciones inespecíficas. Un factor muy importante, para la magnitud de las inmunoprecipitaciones es la proporción de antígeno-anticuerpo en la mezcla. Cuando las cantidades de antígeno y anticuerpo, son equivalentes, se alcanza el óptimo de reacción; pero en un exceso del antígeno o exceso del anticuerpo, la formación del precipitado es parcial o totalmente inhibida.

Inmunoprecipitación en gel

En 1946, Oudin describió un sistema de difusión sencilla de antígeno y anticuerpo en tubo. Ouchterlony en 1947, introdujo el método de inmunodifusión doble y en 1953 Grabar y Williams desarrollaron la inmunolectroforesis.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	29 /108

Existen sistemas en los que las pruebas de precipitación se realizan en una serie de medios semisólidos, por ejemplo, agar, agarosa, poliacrilamida y almidón. El acetato de celulosa, que no es un gel, también puede emplearse como medio soporte. El agar, preparado a partir de algas marinas, se compone de dos polisacáridos, agarosa neutra y agarpectina ácida, que es la causante de su pH ácido. Debido a su interferencia con la migración de partículas cargadas, el agar, como medio para inmunodifusión, es muy sustituido por agarosa. La agarosa es un gel neutro, incoloro y transparente que permite la formación de líneas de precipitación precisas y definidas, debido a que las proteínas más pequeñas que los grandes inmunocomplejos no son retenidas y son eliminadas. El método de Outcherlony, es una doble difusión en agar, se basa en que cuando el antígeno y el anticuerpo, se difunden en un medio semisólido (agar) forman un inmunoprecipitado, estable que se visualiza fácilmente, con luz indirecta o con la ayuda de una lupa.

Contrainmunolectroforesis

Conocida también como inmunolectroforesis a contracorriente y como electroprecipitación. El método se basa en la electroforesis simultánea de antígeno y anticuerpo, en direcciones opuestas, de pozos separados en el gel, los anticuerpos se mueven hacia al cátodo debido a un fenómeno de electroendósmosis, mientras que el antígeno, que debe estar cargado negativamente, se mueve al ánodo, en el punto de encuentro se observa una precipitación. Sus ventajas, sobre la inmunodifusión es que el tiempo se acorta en ésta técnica (30 a 40 minutos) y es cerca de 10 veces más sensible debido a que estamos forzando la reacción. Su principal desventaja es que solo se puede usar antígenos con carga negativa.

Inmunolectroforesis

La inmunolectroforesis ha resuelto con éxito los principales inconvenientes de la inmunodifusión ordinaria: el largo tiempo de resolución y la formación de más de una línea de precipitación. La inmunolectroforesis consta de dos partes: la electroforesis y la interacción antígeno-anticuerpo. La electroforesis separa las proteínas en sus constituyentes de acuerdo a



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	30 /108

sus diferentes propiedades iónicas. Los distintos componentes migran a diferentes velocidades y presentan diferentes movibilidades en un campo eléctrico creado en varios medios de soporte amortiguado tales como agarosa, agar, geles de poliacrilamida y acetato de celulosa. Se basa en la migración proteica, la interacción de la proteína con el medio, el pH del tampón, el voltaje, el tiempo que esta aplicada la corriente y la distancia entre los polos catódico y anódico. En amortiguador básico, la albúmina se mueve más rápidamente hacia el ánodo, mientras que las gamma globulinas se comportan como cationes, precedidas hacia el ánodo por las $\beta, \alpha_2, \alpha_1$ -globulinas.

Es un método de resolución excelente, ya que combina dos técnicas: la electroforesis y la inmunodifusión y es muy difícil que dos sustancias tengan el mismo corrimiento electroforético y a la vez la misma velocidad de difusión. Se emplea para observar pureza en preparación de biológicos, por ejemplo la purificación de gammaglobulinas.

Inmunoprecipitación en capilar

Material y reactivos

Antigammaglobulina humana.

Antiovoalbúmina.

1 barra de plastilina.

Capilares.

Gammaglobulina humana.

Pipetas de 1, 2 y 5 mL.

Ovoalbúmina.

Regla.

Tubos 13 x 100 mm.

Solución de PBS.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	31 /108

Equipo

Refrigerador.

Servicios

Agua

Energía eléctrica.

Procedimiento

1. Tome los capilares y divídalos en 4 partes con un lápiz.
2. Realice diluciones del antígeno, al doble en tubo, partiendo de 10 mg/mL y mantenga constante el anticuerpo.
3. Tome un capilar y absorba por capilaridad el anticuerpo hasta la primera marca, gire 180 grados el capilar y por el otro extremo limpio tome la dilución del antígeno hasta la segunda marca, se mezcla perfectamente bien girando el capilar y colóquelo en una barra de plastilina.
4. Esto se hace para cada dilución del antígeno.
5. Llene dos capilares uno con antígeno y el otro con anticuerpo que son los testigos de la prueba.
6. Deje a temperatura ambiente 1 hora y después guarde en refrigeración 24 a 48 horas.

Resultados

Lea los precipitados con una regla y repórtelos en mm. Construya una gráfica concentración de antígeno vs mm de precipitado.

Manejo de residuos

- Deposite los capilares en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	32 /108

Método de Ouchterlony

Material y reactivos

Albúmina sérica bovina (BSA, por sus siglas en inglés).

AntiBSA

Antigammaglobulina humana

Antiovoalbúmina.

Antisuero humano

Cajas Petri de 100 mm.

Capilares.

Gamma globulina humana.

Mechero.

Ovoalbúmina.

Suero humano.

Sacabocado.

Portaobjetos con una capa de agarosa al 1%.

Equipo

Parrilla de calentamiento.

Refrigerador.

Servicio

Agua

Gas.

Procedimiento

1. Barnice los portaobjetos con agarosa al 0.1% y séquelos al horno. Funda agarosa al 1% y en caliente se coloque 5 mL de la agarosa al portaobjeto, sin derramar. Deje que gelifique.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	33 /108

2. Perfore los portaobjetos con un sacabocados, distribuya los agujeros alrededor de un pozo central, en dónde se colocará el anticuerpo de conejo anti suero humano, coloque el antígeno en los pozos laterales. Se debe de mantener una distancia de aproximadamente 0.5 cm entre pozo y pozo.

3. Incube en cámara húmeda, a temperatura ambiente por 24 horas. Observe las bandas de precipitación.

Resultados

Reportar las reacciones de identidad total, parcial y no identidad, de los antígenos probados.



Figura 1. Imágenes representativas de las reacciones antígeno-anticuerpo obtenidas en una prueba de Ouchterlony. De izquierda a derecha: identidad total, identidad parcial y no identidad.

Manejo de residuos

- Deseche los geles en la basura municipal.

Contrainmunolectroforesis

Material y reactivos

Albúmina humana.

Amortiguador para electroforesis.

Antialbúmina humana.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	34 /108

Cámara de electroforesis.

Placas con agar preparadas igual que para Ouchterlony.

Sacabocado.

Equipo

Fuente de poder.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Gas.

Procedimiento

1. Realice pares de horadaciones, en la placa de agar y coloque el antisuero de tal manera que quede colocado del lado del ánodo.
2. Aplique 30 miliamperes de corriente durante 15 minutos (para despegar el anticuerpo).
3. Desconecte el circuito y adicione el antígeno del lado del cátodo y aplique 30 miliamperes de corriente durante 30 minutos.
4. Apague la fuente, saque las placas y observe la banda de precipitación.

Resultados

Reconocimiento del sistema antígeno-anticuerpo.

Manejo de residuos

- Deseche los geles en la basura municipal.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	35 /108

Inmunoelectroforesis

Material y reactivos

Amortiguador de electroforesis.

Antisuero humano.

Gammaglobulina obtenida en la práctica de obtención de gammaglobulina humana.

Portaobjetos con agarosa.

Perforador con canal.

Equipo

Fuente de poder y equipo de electroforesis.

Refrigerador.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento

1. Realice dos perforaciones y marque un canal en la parte central sin quitar al agar. En la perforación de arriba coloque el suero humano y en la perforación de abajo la muestra (gammaglobulina) marque con una pizca de azul de bromofenol, como indicador de corrimiento de la proteína.
2. Coloque en la cámara de electroforesis y aplique 30 miliamperes de corriente, durante 30 minutos, o hasta que el colorante se desplaza 3/4 partes del portaobjeto.
3. Desconecte la corriente y retire del canal el agar y adicione el antisuero humano.
4. Dejar las muestras en cámara húmeda por 24 en refrigeración. Observe la banda de precipitación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	36 /108

Resultados

Reportar la pureza de la gammaglobulina humana obtenida en la primera práctica.

Manejo de residuos

- Deseche los geles en la basura municipal.

Puntos guía de estudio.

- Fundamento en el que se basan las reacciones de precipitación.
- Tipos de reacciones de precipitación, características y métodos:
 - Precipitación en capilar,
 - Inmunodifusión Ouchterlony,
 - Inmunodifusión radial,
 - Inmunoelectroforesis,
 - Contrainmunoelectroforesis.
- Variables para controlar en las reacciones de precipitación.
- En sistemas antígeno-anticuerpo, características e interpretación de:
 - curvas de precipitación,
 - reacciones de identidad, identidad parcial y no identidad (Ouchterlony en sistema de tres y cinco pozos).
- Aplicación de los métodos de precipitación.

Referencias bibliográficas

1. Crowle AJ. Immunodiffusion, 2nd ed. Academic Press, 1973.
2. Ouchterlony O, Nilsson LA. Immunodiffusion and immunoelectrophoresis. En: Weir DM (editor). Handbook of experimental immunology. Blackwell, 1986.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	37 /108

3. Gochman N, Burke MD. Electrophoretic techniques in today's clinical laboratory. *Clin Lab Med.* 1986; 6(3):403-26.
4. Dunbar BS. Two dimensional electrophoresis and immunological techniques. Plenum Press New York 1987.
5. Catty D. Antibodies. Vol. II. A practical approach. IRL Press. Oxford University Press. Oxford, New York, Tokyo. 1989.
6. Golstein DE, Little RR, Wiedmeyer H, England JD, McKenzie EM. Glycated hemoglobin: methodologies and clinical applications. *Clin Chem.* 1986; 32 (10 Suppl):B64-70.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	38 /108

Práctica 6. Reacciones de aglutinación

Objetivo

Conocer algunas aplicaciones de la reacción inmunológica de aglutinación mediante las pruebas de reacciones febriles, la prueba inmunológica de embarazo y la titulación de hemolisina de conejo.

Fundamento teórico

La aglutinación es una reacción que se presenta entre un antígeno multivalente y un anticuerpo bivalente, siendo alguno de estos particulado. Existen diversos tipos de aglutinación: la aglutinación activa o directa, en donde tenemos que la partícula presenta sus propios antígenos (por ejemplo, bacterias o eritrocitos), mientras que la aglutinación pasiva o indirecta en donde a una partícula se le pega un antígeno soluble. En la aglutinación inversa, a la partícula se le pega un anticuerpo.

Aglutinación directa

Los eritrocitos, los hongos, las bacterias y toda diversidad de especies microbianas pueden ser aglutinados directamente por los anticuerpos séricos. Las pruebas para identificar anticuerpos específicos son llevadas a cabo titulando seriadamente antisueros en diluciones al doble en presencia de una cantidad constante de antígeno.

Aglutinación indirecta

Una amplia variedad de antígenos solubles que puede absorberse de manera pasiva o acoplarse químicamente a los eritrocitos u otras partículas inertes ha extendido en forma particular la aplicación de las reacciones de aglutinación. Muchos antígenos se acoplan de manera espontánea a los eritrocitos formando reactivos estables para la identificación de anticuerpos. Cuando los eritrocitos son usados como partículas inertes, se deben absorber las



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	39 /108

muestras de suero a menudo con eritrocitos lavados no cubiertos por antígeno, para eliminar los anticuerpos heterófilos que podrían, de otra manera, aglutinar inespecíficamente a los eritrocitos. Las ventajas de emplear eritrocitos para recubrirlos con antígenos son: su disponibilidad inmediata, su sensibilidad como indicadores y su posibilidad de almacenamiento. Los eritrocitos pueden ser tratados con formalina, glutaraldehído o aldehído pirúvico y ser almacenados durante tiempo prolongado a 4 °C.

Aglutinación inversa

En la aglutinación inversa emplea un anticuerpo específico unido a una partícula de látex para detectar antígenos solubles en un individuo. Por ejemplo, la aglutinación inversa se utiliza para detectar a la Proteína C Reactiva (PCR) que es una proteína que se secreta a la circulación sanguínea durante la respuesta inflamatoria. La detección de la PCR se realiza utilizando mezclado Anticuerpos anti-PCR fijados a la superficie de partículas de látex con suero del paciente donde se quiere determinar la presencia de PCR. Otros ejemplos de aglutinación inversa son las pruebas para diagnosticar *Candida sp.* y *Neisseria gonorrhoeae*.

Reacciones febriles

Las reacciones febriles pretenden demostrar la presencia de anticuerpos aglutinantes séricos contra bacterias que producen enfermedades febriles, como son las paratifoideas, la fiebre tifoidea, la brucelosis y el tifo. El tiempo ideal para la realización de la técnica es después de la segunda semana de iniciados los síntomas. Para la realización de la técnica se utilizan bacterias donde se expone el antígeno de interés (antígeno O de pared o antígeno H flagelar) y para el caso del antígeno de brucella se usa la *Brucella abortus* que posee tanto antígeno A como proteína M de tal manera que se pueden detectar anticuerpos contra *Brucella suis* (que posee antígeno S pero no M) y contra *Brucella melitensis* (que posee proteína M pero no antígeno S). Para demostrar la presencia de anticuerpos contra rickettsias que producen tifo, se usa un antígeno de reacción cruzada que está presente en *Proteus OX19*.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	40 /108

Son esenciales ciertas reglas en la realización y evaluación de las pruebas de aglutinación febril:

1) Una única prueba de aglutinación es de poco valor. Deben realizarse por lo menos dos y preferiblemente más pruebas cada 3-5 días después de la manifestación de la enfermedad para demostrar un cambio en el título de anticuerpo. Muchos individuos poseen aglutininas en su suero a varios de los antígenos que se usan comúnmente. Estas aglutininas son generalmente de bajo título (con antígenos *Salmonella*, generalmente 20-80 u ocasionalmente 160). Otros tienen aglutininas causadas por inmunización. Un cambio definitivo generalmente un aumento significativo, ocurre en los primeros 8-15 días de la enfermedad. Un incremento progresivo en el título es la principal evidencia de infección. Si las pruebas se realizan tardíamente en la enfermedad, puede notarse una disminución gradual en el título durante un período de tiempo.

2) Los anticuerpos se producen ocasionalmente por estimulación mediante una nueva y no relacionada infección (reacción anamnésica causada por un grupo de antígenos bacterianos).

Prueba inmunológica de embarazo

La placenta casi a partir del comienzo de su etapa de desarrollo produce hormonas o bien propias o en colaboración con el feto (unidad fetoplacentaria). El trofoblasto placentario muy precozmente a los 9 días de su génesis produce cantidades apreciables de gonadotropina coriónica humana (HGC).

La HGC es una glucoproteína producida por las células trofoblásticas después de la concepción. Transcurridas 5 semanas de gestación, la hormona HCG aumenta en orina y alcanza su máximo a las 10 semanas. En la medida que la producción de estrógenos y progesterona por la placenta aumenta, durante el segundo trimestre del embarazo, los niveles de HCG descienden.

La prueba cuantitativa de HCG ha resultado valiosa para diagnosticar la mola hidatiforme (degeneración hidrópica de las vellosidades coriales del trofoblasto), algunas de las



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	41 /108

pacientes que la padecen llegan a presentar niveles extremadamente altos (hasta 6, 000, 000 UI/l), la mayoría muestran valores correspondientes al embarazo normal y algunas presentan niveles relativamente bajos de la hormona (5 UI/mL). El diagnóstico diferencial de niveles elevados de HCG se puede facilitar por el hecho que, durante el embarazo, las pruebas secuenciales tienden a seguir una curva normal de este, mientras que en la enfermedad trofoblástica, las pruebas repetidas a lo largo de varias semanas mostrarán fluctuaciones irregulares.

Para ser aceptable clínicamente, una prueba de embarazo deberá ser: 1) sensible al incremento de las cantidades de HGC, 2) precisa, 3) rápida, 4) reproducible. El método de referencia para la HGC más sensible es el radioinmunoanálisis, que está basado en la competición entre HGC marcada radioactivamente y la no marcada, frente a una pequeña cantidad de un anticuerpo específico.

Para el control de calidad se deberá seguir las instrucciones de los fabricantes en relación de la sensibilidad del método, eliminar reactivos caducados, utilizar controles positivos y negativos en cada ensayo. Tener un segundo equipo para ensayos inmunológicos de una fuente comercial diferente con objeto de repetir ensayos dudosos en paralelo.

Se pueden emplear muestras de orina recogidas a cualquier hora del día, sin embargo, la máxima concentración de HGC se obtiene en la primera orina de la mañana. La orina se recogerá en un recipiente limpio y seco, libre de residuos de detergente, la realización de la prueba deberá realizarse dentro de las primeras 24 horas de su obtención. Deberá refrigerarse 2-8°C si la prueba se realiza durante un período más largo 72 horas como máximo. Por lo general, no se requiere centrifugar o filtrar la muestra, sin embargo puede ser aconsejable en el caso de presentar turbidez.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	42 /108

Hemaglutinación

Material y reactivos

Glóbulos rojos de carnero en solución de alsever

Hemolisina de conejo (antisuero vs glóbulos rojos de carnero)

Micropipetas (50 μ L)

Placas de microtitulación de 96 pozos con fondo en V.

Solución de PBS

Equipo

Incubadora.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento

- 1) Coloque 50 μ L de solución PBS en cada uno de los 12 pozos de una fila de una placa de microtitulación.
- 2) Utilizando una micropipeta coloque 50 μ L de suero en el pozo 1, mezcle y tome 50 μ L, y transfíralo al pozo 2 y así sucesivamente hasta el pozo 11.
- 3) Deje el pozo 12 como testigo negativo de la prueba.
- 4) Agregue 50 μ L de una suspensión de glóbulos rojos de carnero al 1%, en cada uno de los pozos de toda la fila, mezclando bien.
- 5) Incube a 37 °C por 1 hora.
- 6) Lea el título de aglutinación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	43 /108

Resultados

El pozo 12 no debe presentar aglutinación y en caso de que esta se presente, se descarta la prueba. El título del suero se registra como la recíproca de la máxima dilución en la cual aún se observa aglutinación de los eritrocitos. Por ejemplo, hemaglutinación positiva hasta el pozo cinco, es decir, dilución 1:32, por lo tanto el título del suero es de 32.

Manejo de residuos

- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración del 4 al 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.4 al 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Reacciones febriles

Material y reactivos

Aplicadores de madera.

Equipo de antígenos:

- 1) *Salmonella typhi* (antígenos O y H).
- 2) *Salmonella paratyphi* A.
- 3) *Salmonella paratyphi* B (*Salmonella schottmuelleri*).
- 4) *Brucella abortus*.
- 5) *Proteus* OX19.

Pipeta serológica de 0.2 mL.

Placa de vidrio con 6 divisiones.

Sueros testigos positivo y negativo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	44 /108

Suero problema.

Equipo

Ninguno.

Servicios

Agua.

Procedimiento

Procedimiento cualitativo

1. Coloque una gota del suero problema en cada una de las 6 divisiones de la placa de vidrio.
2. Adicione una gota de cada antígeno, mezcle con un aplicador y continúe inclinando la placa con movimiento lento de vaivén, de manera que la suspensión se acumule en uno de los extremos y regrese a la posición horizontal, durante 2 a 3 minutos.
3. Las muestras positivas deberán comenzar a aglutinar a los 30 segundos y completarse a los 3 minutos. En caso de negatividad, no descartar sino hasta que hayan transcurrido 5 minutos. Compare con los testigos positivo y negativo.

Procedimiento cuantitativo

1. Inicie depositando los siguientes volúmenes de suero problema positivo en el procedimiento cualitativo y agregue una gota del antígeno positivo, calcule el título de acuerdo al siguiente cuadro de equivalencias:

Volumen de suero mL	Dilución	Título
0.08	1:20	20
0.04	1:40	40
0.02	1:80	80
0.01	1:160	160
0.005	1:320	320



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	45 /108

Resultados

Reportar como el título, que corresponde al inverso de la máxima dilución de suero problema que da una aglutinación completa.

Manejo de residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.
- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración del 4 al 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.4 al 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Prueba inmunológica de embazo (PIE)

Material y reactivos

Aplicadores de madera.

Control positivo (orina).

Control negativo (orina).

Orina problema.

Pipetas graduadas de 1 mL.

Portaobjetos.

Suspensión de partículas de látex o eritrocitos recubiertos con anti-HCG purificados.

Equipo

Ninguno.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	46 /108

Servicio

Agua.

Procedimiento

1. Realice todo el proceso a temperatura ambiente.
2. Atempere los reactivos antes de usarlos.
3. Coloque en el tubo de reacción:
 - 0.1 mL de orina.
 - 0.2 mL de suspensión de anticuerpos.
 - 0.2 mL de suspensión de eritrocitos.
4. Mezcle suavemente y coloque el tubo en posición vertical en gradilla en un lugar libre de vibraciones y exposición directa a los rayos del sol.
5. Observe el resultado a las dos horas.

Resultados

Positivo: los eritrocitos no aglutinados sedimentan formando anillos de diverso tamaño con tendencia a formar botón que ocasionalmente puede presentar irregularidades.

Negativo: los eritrocitos aglutinados sedimentan formando una capa que cubre el fondo del tubo, ocasionalmente los márgenes de la malla se marcan y debe considerarse la repetición de la prueba unos días después.

Manejo de residuos

- La orina se vierte directamente al drenaje.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	47 /108

Puntos guía de estudio.

- ¿Qué es la aglutinación inmune?
- En qué consisten los siguientes tipos de la reacción de aglutinación:
 - activa o directa,
 - pasiva o indirecta,
 - inversa o reversa
 - inhibición de la aglutinación
- Para las pruebas siguientes:
 - Titulación de hemolisina (anticuerpo-antígeno),
 - Reacciones febriles (Weil-Felix, Huddleson, Widal),
 - PIE (prueba inmunológica de embarazo), fundamento de inhibición de la aglutinación.

Referencias bibliográficas

1. Lynch, M.J. Métodos de laboratorio. México: Interamericana, 1988.
2. Davidson, I. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Barcelona: Salvat, 1983.
3. Bellanti, J.A. Inmunología. México: Interamericana, 1986.
4. Todd-Sanford. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. México: Salvat, 1991.
5. Weir D.M. Handbook of Experimental Immunology. Vol 3. Oxford: Blackwell Scientific Publication, 1986.
6. Stanley J. Chapter 14: Agglutination. En: Esperti CL, editor. Essentials of Immunology and Serology. Estados Unidos: Delmar; 2002. p.202-224.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	48 /108

Práctica 7. Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (ELISA, por sus siglas en inglés)

Objetivo

Determinar las concentraciones de antígeno y la dilución de conjugado óptimas para un sistema de ELISA.

Fundamentación teórica.

Esta técnica, al igual que el radioinmunoanálisis (RIA), tiene una buena sensibilidad para detectar antígenos o anticuerpos (1-50 ng/mL). ELISA tiene la ventaja sobre RIA, en que no usa material radioactivo y por lo tanto no se requiere una licencia para su manejo, además la enzima usada tiene una duración mayor, que los isótopos usados en RIA. ELISA se basa en una fase sólida con el fin de separar el antígeno (Ag) o el anticuerpo (Ac) libre del complejo antígeno-anticuerpo (Ag-Ac). En éste el material que se utiliza como fase sólida para adherir el Ac o el Ag pueden ser tubos, microplacas, esferas, discos; los cuales pueden ser de celulosa, nylon, polivinilo, poliacrilamida, poliestireno y partículas de agarosa. La inmovilización del antígeno o anticuerpo en la fase sólida es por enlace covalente o por adsorción continua de interacciones no covalentes, altas concentraciones de antígeno o anticuerpo reducen los enlaces inespecíficos y mejora los específicos. Se debe determinar la concentración óptima de revestimiento para cada ensayo. Los ensayos inmunoenzimáticos heterogéneos (ELISA) pueden ser: 1) Directos, 2) Indirectos, 3) Sándwich o de doble anticuerpo y 4) Por inhibición competitiva.

La técnica de ELISA se puede describir brevemente en los siguientes pasos:

1. El antígeno o el anticuerpo se pegan a placas de poliestireno o polivinilo.
2. La placa se bloquea con una proteína irrelevante, para prevenir cualquier unión no específica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	49 /108

3. El antígeno o anticuerpo de prueba se adiciona y toda la proteína no pegada se elimina con los lavados.

4. El antígeno o el anticuerpo se detecta por un ligando acoplado a una enzima. Este ligando se une al anticuerpo o al antígeno de prueba el ligando libre se elimina con los lavados.

5. La unión del ligando se visualiza con la adición de un cromógeno, el cual es incoloro y mediante la acción de la porción enzimática del ligando se produce un compuesto colorido que es proporcional al anticuerpo o antígeno de prueba.

En esta técnica se pueden usar diferentes enzimas, por ejemplo: peroxidasa de rábano picante, beta galactosidasa, fosfatasa alcalina etc. que tienen como característica su bajo precio, su estabilidad y sustratos accesibles entre otras características.

ELISA se ha usado para la cuantificación de hormonas, en enfermedades infecciosas por ejemplo: detección de anticuerpos anti-VIH, evaluación del TORCH (detección simultánea de anticuerpos anti-toxoplasma, rubeola, citomegalovirus y herpes), entre otras.

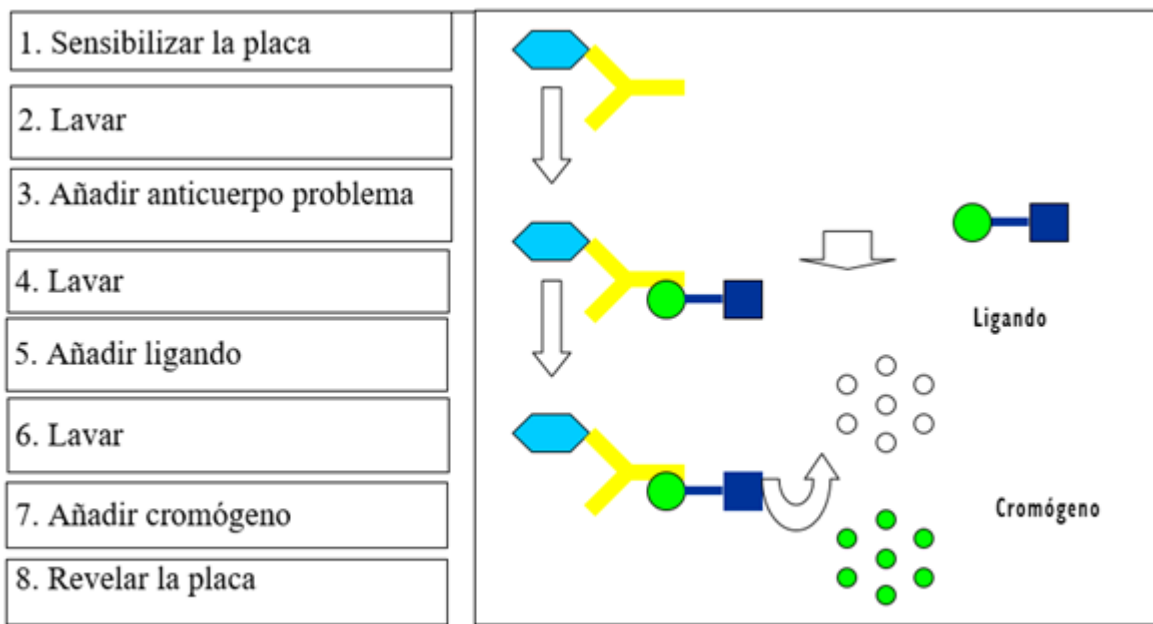


Figura 2. Esquema que representa los pasos del método de ELISA.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	50 /108

Material y reactivos.

antiIgG humana conjugada a peroxidasa de rábano picante.

O-fenilendiamina.

Peróxido de hidrógeno.

Pipetas graduadas de 5 mL.

Micropipetas.

Placas de poliestireno o polivinilo de alta adherencia de 96 pozos.

Puntas para pipeta.

Soluciones conocidas de IgG.

Solución amortiguador de recubrimiento. Carbonato-bicarbonato pH9.6.

Solución de bloqueo para ELISA.

Solución PBS.

Solución PBS-Tween.

Solución sustrato de peroxidasa de rábano picante.

Equipo

Incubadora bacteriológica.

Lector para placas de ELISA.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento.

La técnica de ELISA será dividida en dos sesiones: en una práctica se preparará el antígeno y se pegará a la placa realizando 7 diluciones y en la segunda práctica se titulará un conjugado de peroxidasa unido a un anticuerpo de chivo anti-cadenas γ humanas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	51 /108

1. Diluya una solución de IgG (también se puede utilizar gammaglobulina humana) haciendo diluciones al doble partiendo de una concentración inicial de 128 $\mu\text{g/mL}$.
2. Coloque en una gradilla 7 tubos, que se marcan de la A hasta la G. En el tubo A coloque 3 mL de la solución de IgG a una concentración de 128 $\mu\text{g/mL}$ disuelta en amortiguador de recubrimiento y realice diluciones al doble con volúmenes de 1.5 mL del amortiguador de recubrimiento en los tubos de la B a la G, de tal manera que al final tenga todos los tubos con 1.5 mL de volumen, excepto el tubo G que se queda con 3.0 mL.
3. Coloque con una pipeta automática 100 μL del amortiguador de recubrimiento en la fila H de la placa de poliestireno (testigo negativo del antígeno). Realice lo mismo con el resto de las filas empezando con la fila G y terminando con la fila A en ese orden y usando una sola punta coloque siempre 100 μL en cada pozo.
4. Incubé por 1 hora a 37 °C.
5. Elimine el sobrenadante y adicione 100 μL de solución de bloqueo durante 30 minutos a temperatura ambiente.
6. Deseche el sobrenadante y lave 4 veces con la solución PBS-Tween, deje actuar un minuto la solución de lavado antes de tirar los sobrenadantes.
7. Etiquete 11 tubos del 1 al 11 y realice diluciones al doble en PBS de la antiIgG humana conjugada a peroxidasa de rabano picante, comience de una dilución 1:500 y use volúmenes de 1 mL para hacer las diluciones.
8. Coloque en la columna 12, 100 μL de PBS (testigo de conjugado). Adicione el conjugado partiendo de la dilución con menor concentración, tubo número 11 a la columna 11 y continúe en ese orden hasta llegar al tubo 1. Utilice una sola punta. A cada pozo se le adicionan 100 μL de la dilución correspondiente. Incube la placa a 37 °C por una hora.
9. Lave 4 veces con la solución PBS-tween igual que en el paso número 6.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	52 /108

10. Adicione 100 μ L de la solución que contiene O-fenilendiamina y peróxido de hidrogeno en cada pozo e incube por 15 minutos a 37 °C.

11. Lea a 490 nm en un lector de ELISA.

Nombre.-----

Fecha.-----

Antígeno.-----

Anticuerpos.-----

Conjugado.-----

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Figura 3. Esquema de una placa de poliestireno de alta adherencia; utilizada para la estandarización de metodologías de ELISA.

Resultados

Construir las gráficas de dilución del conjugado vs absorbancia para la dilución de conjugado. Determine la concentración óptima de antígeno.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	53 /108

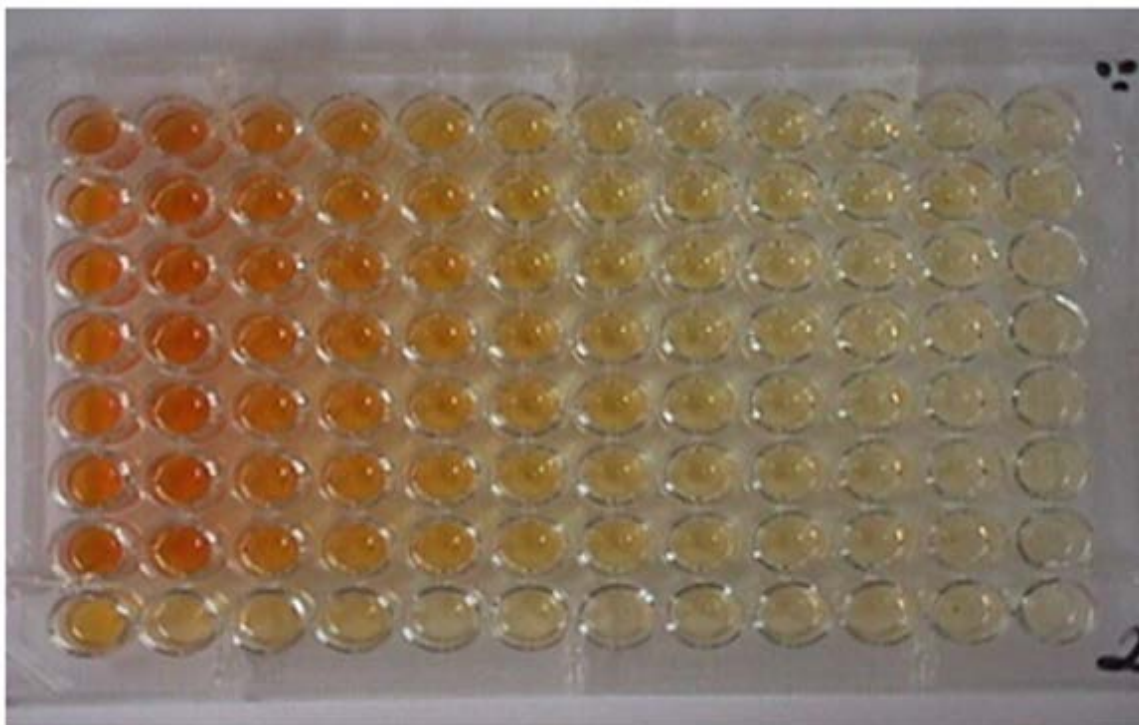


Figura 4. Placa de ELISA revelada.

Manejo de residuos.

- Los residuos líquidos se vierten al drenaje mientras que los sólidos se desechan a la basura municipal.

Puntos guía de estudio.

- En enzimoimmunoensayos, tipos de sistemas homogéneos y heterogéneos.
- Fundamento de la técnica de ELISA.
- Enzimas empleadas y criterios de selección de enzimas.
- Tipos de soporte (fase sólida) y formas en las que se presenta.
- Principio de los diferentes tipos de ELISA y en qué consisten:
 - ELISA directo,
 - ELISA indirecto,



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	54 /108

- ELISA competitivo,
 - ELISA inhibición,
 - ELISA sándwich.
- Ventajas y desventajas del método ELISA en comparación con RIA y ensayos quimioluminiscientes.
 - Aplicaciones clínicas.

Referencias bibliográficas

1. Carpenter AB. Enzyme linked immunosorbent assay. En: Rose NR *et al* (Edit.). Manual of clinical laboratory immunology. Washington D.C.: American Society for Microbiology, 1992.
2. Stites DP, Terr AI, Parslow TG. Inmunología básica y clínica. 10a ed. México: El Manual Moderno, 2003.
3. Weir DM. Handbook of experimental immunology. Fourth ed. Blackwell Scientific Publications, 1986.
4. Terninck TH, Avrameas S. Técnicas inmunoenzimáticas. México. Grupo Iberoamericana, 1990.
5. Engvall E. Enzyme immunoassay ELISA and EMIT. *Methods Enzymol.* 1980; 70(A):419-39.
6. Hermann EJ. Enzyme linked immunoassay for the detection of microbial antigens and their antibodies. *Adv Appl Microbiol.* 1986; 31:271.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	55 /108

Práctica 8. Factor inhibidor de la migración de los leucocitos (LIF) e intradermoreacciones

Objetivo

Evaluar la inmunidad celular mediante la técnica de LIF.

Fundamentación teórica

Existen muchas pruebas para determinar la inmunidad celular. La prueba intradérmica, es simple de efectuar e indica un previo contacto con el antígeno de prueba. Es una prueba de hipersensibilidad retardada, la cual no tiene relación alguna con la protección. Una desventaja de esta prueba es que es de tipo semicuantitativo y los complejos inmunes presentes en ciertos padecimientos, bloquean la prueba dando una reacción negativa.

La prueba MIF, es una prueba de inmunidad celular *in vitro* mide la actividad de una linfocina, liberada por el linfocito T sensibilizado con un antígeno específico y tiene como célula blanco al macrófago. El factor inhibidor de la migración de los leucocitos (LIF, por sus siglas en inglés), que es la técnica que se realizará en esta práctica.

Otras pruebas para evaluar la respuesta celular son: la prueba de parche en las dermatitis de contacto, la respuesta a mitógenos, el cultivo mixto de linfocitos, la citotoxicidad mediada por células, entre otras.

Material y reactivos.

Caja Petri de 100 mm con capilares y cubreobjetos estériles.

Cámara de Bloom para el LIF.

Heparina 250 U (0.1 mL) estéril.

Jeringa de 20 mL



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	56 /108

Jeringa de 1 mL.

Lápiz diamante.

Mechero Bunsen

Medio de cultivo MEM o RPMI.

PPD 1 U (0.1 mL)

Parafina.

Pinzas.

Rejilla de alambre.

Silicón sólido.

Tripié

Tubos de 13 x 100 mm.

Tubos siliconizados estériles.

Varidasa 25 U/0.1 mL.

Equipo

Centrífuga clínica.

Incubadora.

Proyector de acetatos.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Gas.

Procedimiento

1. Obtenga 20 mL de sangre por punción venosa, con una jeringa de 20 mL con 250 U de heparina.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	57 /108

- Deje sedimentar la sangre en la jeringa, durante 45 minutos a 1 hora, a 37 °C.
- Doble la aguja y colecte el plasma rico en leucocitos en un tubo siliconizado estéril.
- Lave los leucocitos dos veces con medio de cultivo por centrifugación a 2000 rpm por 5 minutos.
- Resuspenda el paquete celular en 0.5 mL de medio de cultivo.
- Llene capilares en forma uniforme sellando (a la flama) un extremo del capilar.
- Centrifugue los capilares por un minuto a 1500 rpm.
- Córtelos con un lápiz diamante en donde termina el paquete de leucocitos.
- Pegue con parafina uno de los cubreobjetos a la cámara de Bloom, asegúrese de que quede bien sellada el piso de la cámara. Coloque una gota de silicón sólido en el fondo de la cámara.
- Fije los capilares en las cámaras, asegure el extremo sellado en el silicón de manera que los leucocitos migren sobre el cubreobjetos a partir del extremo abierto
- Cierre la cámara con otro cubreobjeto (techo) y por los orificios superiores introduzca medio de cultivo.
- Introduzca 0.1 mL del antígeno de prueba (PPD o varidasa), solamente en unos de los compartimientos de la cámara (problema).
- Selle con parafina los orificios.
- Incube por 24 horas a 37 °C colocando las cámaras en posición horizontal.
- Realice la medición de los halos de migración usando para ello un proyector de acetatos, los halos se proyectan sobre una hoja de papel se marcan con lápiz, se recortan y se pesan.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	58 /108

Resultados

Calcule el porcentaje de migración, el peso del papel donde se proyectó el halo de migración sin antígeno corresponde al 100% de migración. Pese los halos correspondientes a la cámara con antígeno y mediante una regla de tres calcule el porcentaje de migración de los leucocitos con la presencia del antígeno de la siguiente manera:

Peso del halo sin antígeno ————— 100% de migración

Peso del halo con antígeno ————— X

X= % de migración en presencia del antígeno.

Este resultado réstelo de 100 y calcule el porcentaje de inhibición de la migración; si el resultado es igual o mayor a 20%, indica que hubo producción de LIF y por lo tanto el individuo tiene buena respuesta inmune de tipo celular hacia el antígeno específico. Si por el contrario el porcentaje de inhibición de la migración es menor a 20%, se considera que no ha habido producción de LIF.

Manejo de residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.
- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración del 4 al 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.4 al 0.7%



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	59 /108

manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Puntos guía de estudio.

- Inmunidad celular (funciones).
- Evaluación de la inmunidad celular:
 - técnicas *in vivo*,
 - técnicas *in vitro*.
- LIF:
 - características fisicoquímicas y biológicas,
 - técnicas para determinar la acción de LIF,
 - fundamento,
 - interpretación de resultados,
 - utilidad clínica.

Referencias bibliográficas

1. Bloom BR, David JR (editors). In vitro methods in cell mediated and tumor immunity. Academic Press. New York and London; 1976.
2. Djeu JY. Monocyte/macrophage function. En: Rose NR *et al* (editors). Manual of clinical laboratory immunology. Washington D.C American Society for Microbiology, 1992.
3. Smith DL *et al*. Delayed hypersensitivity skin test. En: Rose NR *et al* (editors). Manual of clinical laboratory immunology. Washington D.C. American Society for Microbiology, 1992.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	60 /108

Práctica 9. Antiestreptolisinas

Objetivo

Cuantificar la presencia de antiestreptolisinas utilizando una prueba de neutralización.

Fundamentación teórica

Los estreptococos son bacterias esféricas Gram positivas, forman parte de la flora normal humana, otros se relacionan con importantes enfermedades humanas: faringitis estreptocócica, endocarditis, pioderma estreptocócico, erisipela, fiebre puerperal e infecciones generalizadas.

Existen dos enfermedades asociadas a la infección con estreptococos β hemolíticos que son: la fiebre reumática que generalmente está precedida de una infección del aparato respiratorio y la glomerulonefritis la cual se asocia con infecciones en piel (piodermas). La fiebre reumática es una secuela grave de las infecciones por estreptococos debido a las lesiones en válvulas y músculo cardíaco. Ciertas cepas de *Streptococcus pyogenes* del grupo A tienen antígenos de reacción cruzada con antígenos de tejido cardíaco humano, de tal manera que los anticuerpos generados contra antígenos de estreptococos reconocen a los antígenos de reacción cruzada presentes en el tejido cardíaco. Los signos y síntomas de la fiebre reumática incluyen la fiebre, malestar, poliartritis migratoria no supurativa, inflamación de tejido cardíaco (endocardio, miocardio, pericardio).

La otra secuela grave posestreptocócica es la glomerulonefritis la cual se presenta como una secuela de infección estreptocócica en piel (pioderma). La glomerulonefritis se inicia por complejos antígeno anticuerpo y en los casos agudos se presenta sangre y proteínas en la orina, edema, hipertensión y retención de nitrógeno uréico.

Los estreptococos producen un número importante de sustancias que están involucradas en la patogenia: 1) Estreptocinasa (fibrinolisisina), 2) Estreptodornasa



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	61 /108

(estreptodesoxirribonucleasa), 3) Hialuronidasa, 4) Toxina eritrogénica, 5) Hemolisinas (estreptolisinas).

Muchos estreptococos son capaces de lisar eritrocitos in vitro, si el rompimiento del eritrocito es total, el estreptococo recibe el nombre de β hemolítico. Mientras que si la lisis es incompleta con la formación de un pigmento verde el estreptococo será α hemolítico.

Los estreptococos β hemolíticos del grupo A producen dos tipos de hemolisinas (estreptolisinas). La estreptolisina O es una proteína de 60,000 Daltons con actividad hemolítica solamente en su forma reducida, es un buen inmunógeno que induce la formación de los anticuerpos antiestreptolisina O. Estos anticuerpos bloquean la acción de la estreptolisina O y este fenómeno de neutralización nos proporciona las bases para la determinación de la cantidad del anticuerpo antiestreptolisina O sérica (AEO). La estreptolisina S es una proteína no inmunogénica, pero con antigenicidad y es la responsable de las zonas de hemólisis que se observan alrededor de las colonias de estreptococos en las placas de gelosa sangre.

Material y reactivos

Glóbulos rojos de grupo O al 5%.

Gradilla.

Jeringa, torundas con alcohol.

Reactivo de estreptolisina O.

PBS.

Suero problema.

Tubos de ensayo de 13 x 100.

Tubos para recolección sanguínea con anticoagulante EDTA.

Tubos para recolección sanguínea sin anticoagulante.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	63 /108

7. Incube a 37 °C por 45 minutos, agite suavemente cada 10 minutos.

8. Centrifugue a 1500 rpm por un minuto y realice la lectura.

Resultados

Los resultados se obtienen tomando la última dilución donde no hay hemólisis. El tubo 6 es el testigo positivo de hemólisis y el tubo 7 es el testigo negativo de hemólisis

Los resultados se reportan en unidades Todd, que corresponde a la inversa de la dilución en donde no se presenta hemólisis.

Manejo de residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.
- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración del 4 al 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.4 al 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Puntos guía de estudio.

- *Streptococcus*:
 - clasificación,
 - características,
 - estructura.
- Fundamento de las reacciones de neutralización.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	64 /108

- Fundamento de la técnica y variables a considerar en la determinación de antiestreptolisinas.
- Antiestreptolisinas:
 - características,
 - actividad biológica,
 - prueba de laboratorio,
 - valores de referencia.
- Fiebre reumática:
 - agente etiológico,
 - cuadro clínico,
 - criterios de Jones,
 - diagnóstico,
 - tratamiento.

Referencias bibliográficas.

1. Lynch, M.J. Métodos de laboratorio. México: Interamericana, 1988.
2. Davidson, I. Diagnóstico clínico por el laboratorio. Barcelona: Salvat, 1983.
3. Todd-Sanford. Diagnóstico y tratamiento clínico por el laboratorio. Barcelona: Salvat, 1991.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	65 /108

Práctica 10. Cuantificación de linfocitos

Objetivo

Determinar los porcentajes de linfocitos B y T en sangre periférica mediante la técnica de rosetas.

Fundamento teórico

Las células germinales de la médula ósea e hígado fetal, que se dirigen al timo mediante un fenómeno llamado "Homing," y penetran en él sufren estadios de diferenciación, lo que da como resultado la migración de linfocitos T maduros a la sangre y tejidos linfoides periféricos. La maduración del linfocito T en timo, se acompaña de una serie compleja de cambios en su genotipo y fenotipo, su primer marcador que aparece sobre su superficie es el CD2 (receptor para glóbulos rojos de carnero), aparece un rearreglo de los genes TCR (receptor de la célula T) posteriormente aparece el receptor CD3 (marcador, al igual que el CD2, que poseen todos los linfocitos T). Al madurar el linfocito todavía en timo le aparecen los marcadores CD1, CD4 y CD8 entre otros receptores y es en timo donde se lleva a cabo una selección de los linfocitos T eliminándose aquellas clones de alta afinidad autorreactivas y aquellas sin sentido, y perduran las clones útiles. Los linfocitos se caracterizan de acuerdo a los marcadores de linfocitos; por ejemplo, el linfocito T citotóxico expresa el CD8, mientras que los linfocitos T cooperadores Th1 y Th2 expresan el CD4. Dentro de las funciones de la respuesta inmune mediada por linfocitos T están: respuestas efectoras antígeno-específicas, regulación de la actividad de otros linfocitos, mediante la secreción de linfocinas. Dentro de las funciones efectoras, tenemos que son: citotoxicidad mediada por células e inmunidad mediada por células, intervienen en la activación y diferenciación de células T y B (cooperación y amplificación), regulación de respuestas inmunitarias y secreción de linfocinas potentes como pueden ser el interferón gama o las interleucinas.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	66 /108

Los linfocitos B son las células precursoras de las células plasmáticas (productoras de inmunoglobulinas), su fuente principal es hígado fetal y médula ósea. En las aves el órgano que les da su inmunocompetencia es la bursa de Fabricio; pero en los mamíferos, de médula ósea ya salen con marcadores de células B. Las células B tienen un receptor específico el CD19 y CD20 entre otros tienen receptores para C3b de complemento.

Existen varios métodos para cuantificar los linfocitos, se puede hacer por citometría de flujo, usando anticuerpos monoclonales, marcados con una sustancia fluorescente (isotiocianato de fluoresceína o la ficoeritrina). El citómetro de flujo separa las poblaciones celulares, de acuerdo a su forma, tamaño y granulaciones, de tal manera en que se selecciona la nube de linfocitos con un cerco (*gate*) y se calcula el porcentaje de linfocitos marcados anti-CD3 (para linfocitos T totales), anti-CD4 para linfocitos cooperadores/inductores, anti-CD8 para cuantificar los linfocitos citotóxicos y el anti CD19 para cuantificar los linfocitos B. La determinación se puede realizar también mediante inmunofluorescencia o mediante la técnica de rosetas.

En esta práctica se cuantificarán linfocitos T, mediante formación de rosetas E y los linfocitos B, mediante la determinación de receptores para C3b, rosetas EAC.

Material y reactivos

Glóbulos rojos de carnero.

Hemolisina de conejo antiglóbulos rojos de carnero titulada a una unidad. subaglutinante.

Jeringas.

Lymphoprep (ficoll- hypaque).

Pipetas Pasteur.

Pipetas graduadas.

Portaobjetos y cubreobjetos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	67 /108

Sangre humana

Solución salina amortiguada.

Suero humano fresco.

Tubos de 12 x 75 mm.

Tubos de 13 x 100 mm.

Tubos para recolección sanguínea con anticoagulante heparina.

Equipo

Centrifuga clínica.

Incubadora.

Microscopio.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento.

Los mononucleares se separan con ayuda de un gradiente de ficoll-hypaque, con el siguiente procedimiento:

1. Extraer 5 mL de sangre que se colocan en un tubo con 50 U de heparina.
2. Diluya la sangre heparinizada con un volumen igual de salina amortiguada.
3. Coloque 2.5 mL de ficoll-hypaque en un tubo de 13 x100 mm, adicione 2.5 mL de sangre diluida.
4. Centrifugue a 800g por 20 minutos.
5. Separe la banda de mononucleares con la ayuda de una pipeta Pasteur.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	68 /108

6. Colecte solamente la banda de mononucleares y transfiera a un tubo. Lave tres veces con solución salina amortiguada.

Formación de rosetas E (linfocitos T)

1. Coloque en un tubo de 12 x 75 mm un volumen de 0.25 mL de una suspensión de eritrocitos de carnero ajustados al 1 % en solución salina amortiguada.
2. Agregue 0.25 mL de una suspensión de linfocitos. Incube a 37 °C durante 5 minutos, centrifugue a 1500 rpm durante 3 minutos y mantenga en refrigeración (baño de hielo) durante toda la noche.
3. Tome una alícuota y lea las rosetas activas.
4. Cuente un total de 150 a 200 células, formadoras o no de rosetas. Aquellos linfocitos que unan 3 o más eritrocitos sobre la superficie se considera una roseta.

Formación de rosetas EAC (linfocitos B)

1. Lave los glóbulos rojos de carnero en salina amortiguada y prepare 5 mL de una solución al 5 % en salina amortiguada.
2. Adicione 5 mL de solución de hemolisina IgM a un título subaglutinante. Incube la mezcla a 37 °C durante 30 minutos y agite frecuentemente.
3. Lave los eritrocitos tres veces por centrifugación a 4000 rpm por 5 minutos y adicioneles 5 mL de complemento humano fresco (complemento) a una dilución de 1:40.
4. Incube a 37 °C por 30 minutos agitando frecuentemente. Lave la suspensión 3 veces con salina amortiguada y ajuste a una concentración final del 1% en solución salina amortiguada.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	69 /108

5. Coloque en un tubo de 12 x 75 mm, un volumen de 0.25 mL de la suspensión de eritrocitos (EAC) y mezcle con una suspensión de 0.25 mL de linfocitos.
6. Centrifugue a 1500 rpm durante tres minutos y mantenga en reposo a temperatura ambiente durante 30 minutos.
7. Aspire el sobrenadante y agite suavemente el sedimento con el dedo y coloque una gota entre porta y cubreobjeto, y observe las rosetas con el objetivo de 10X o 40X.
8. Cuente un total de 150 a 200 células; formadoras o no de rosetas. Aquellos linfocitos que presenten tres o más eritrocitos adheridos en su superficie se considerarán positivos.

Resultados

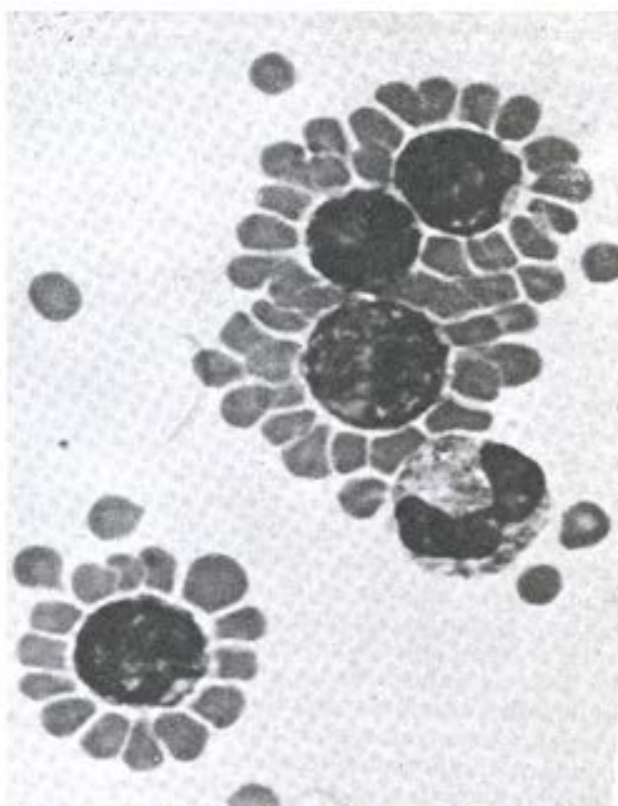


Figura 5. Linfocitos T formando rosetas



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	70 /108

Calcule el porcentaje de linfocitos T, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje de linfocitos T} = \frac{\text{Número de linfocitos formando rosetas E}}{\text{Número total de linfocitos contados}} \times 100$$

Calcule el porcentaje de linfocitos B, mediante la siguiente fórmula:

$$\text{Porcentaje linfocitos B} = \frac{\text{Número de linfocitos formando rosetas EAC}}{\text{Número total de linfocitos contados}} \times 100$$

Valores normales:

- Linfocitos T (rosetas E): $63 \pm 8\%$
- Linfocitos B (rosetas EAC): $37 \pm 6\%$.

Manejo de residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.
- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.

Puntos guía de estudio.

- Cantidad de leucocitos en sangre.
- Características morfológicas de los linfocitos.
- Subpoblaciones o tipos de linfocitos y sus funciones.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	71 /108

- Técnicas útiles para separar y cuantificar subpoblaciones de linfocitos.
- Técnica de Rosetas EAC y E (fundamento, interpretación y marcadores presentes), Citometría de flujo e Inmunofluorescencia.
- Receptores que se ponen de manifiesto en los linfocitos B y T cuando se realiza la técnica de rosetas.
- Valores de referencia de la técnica de rosetas.

Referencias bibliográficas.

1. Fulwyler MJ. Flow cytometry and cell sorting. *Blood Cells*. 1980; 6:173.
2. Ryan DH, Fallon MA, Horan PK. Flow cytometry in the clinical laboratory. *Clin Chim Acta*. 1988; 171:125.
3. Giorgi JV. Immune cell phenotyping by flow cytometry. En: Rose NR et al. (editors). Manual of clinical laboratory immunology. Washington D.C. American Society for Microbiology, 1992.
4. WHO/IARC Special technical report. Identification enumeration and isolation of B and T lymphocytes from human peripheral blood. *Scand. J Immunol*. 1974; 3:521-532.
5. Hunt SV. Separation of lymphocyte sub-populations. Cellular immunology. En: Weir DM (editor). Handbook of experimental immunology. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1986.
6. Serrano-Miranda E. Linfocitos T y B y subpoblaciones de linfocitos T. En: Estrada-Parra S (editor) Inmunología básica y clínica. México: ENCB, IPN. 1994.
7. Shortman K, Wu L. Early T lymphocytes progenitors. *Annual reviews of Immunology*. 1996; 14:29-47.
8. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. Características principales de las moléculas CD. Inmunología Celular y Molecular. Tercera edición. McGraw –Hill interamericana. España. 1998.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	72 /108

Práctica 11. Tipificación de subpoblaciones de linfocitos y células de la respuesta inmune por citometría de flujo.

Objetivo

Que el alumno conozca el método de citometría de flujo y lo utilice para determinar el porcentaje de las principales poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica.

Fundamento teórico.

El sistema inmune está constituido por un conjunto de órganos, tejidos y células distribuidos por todo el cuerpo, los linfocitos son las células centrales de la respuesta inmune específica¹.

Los linfocitos y el resto de los leucocitos presentan antígenos específicos denominados grupos de diferenciación o CDs por sus siglas en inglés, que se utilizan como marcadores para tipificar las diferentes poblaciones celulares (inmunofenotipo), los CDs que de manera general definen a las células T son: CD2, CD3, CD4 y CD8, mientras que las células B expresan CD19, CD20, CD21 y CD22, y las células mieloides expresan CD13, CD14, CD15 y CD33. Sin embargo, algunos CD's pueden presentarse en dos o más linajes celulares como los CD5 y CD38 que se expresan en células B y T. Por tal motivo, para llevar a cabo una inmunotipificación específica es necesario el empleo de dos o más marcadores².

La inmunotipificación de las diferentes poblaciones celulares se realiza mediante reacciones antígeno anticuerpo, en las que se utilizan anticuerpos monoclonales que reconocen a los CDs específicos para cada una de las estirpes celulares. Esos anticuerpos monoclonales se acoplan a fluorocromos para evidenciar su presencia mediante citometría de flujo².

Citometría de flujo

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	73 /108

una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz. Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares, como el tamaño, forma y complejidad, además de cualquier componente celular o función que pueda marcarse con un fluorocromo (molécula capaz de absorber luz a una determinada longitud de onda (energía de excitación) y emitir a una longitud superior). Las aplicaciones más relevantes de la citometría de flujo en la práctica médica se relacionan con la hematología e inmunología clínicas, se evalúan parámetros como número y clasificación de células sanguíneas. Esta técnica también se utiliza en el conteo de subpoblaciones de linfocitos en pacientes con el virus de la inmunodeficiencia humana, así como en la caracterización de leucemias agudas y síndromes linfoproliferativos crónicos, entre otros padecimientos³.

La citometría de flujo es una técnica de análisis multiparamétrico que mide características como dispersión de luz y emisión de fluorescencia de las partículas (principalmente células) cuando pasan a través de un rayo láser⁴.

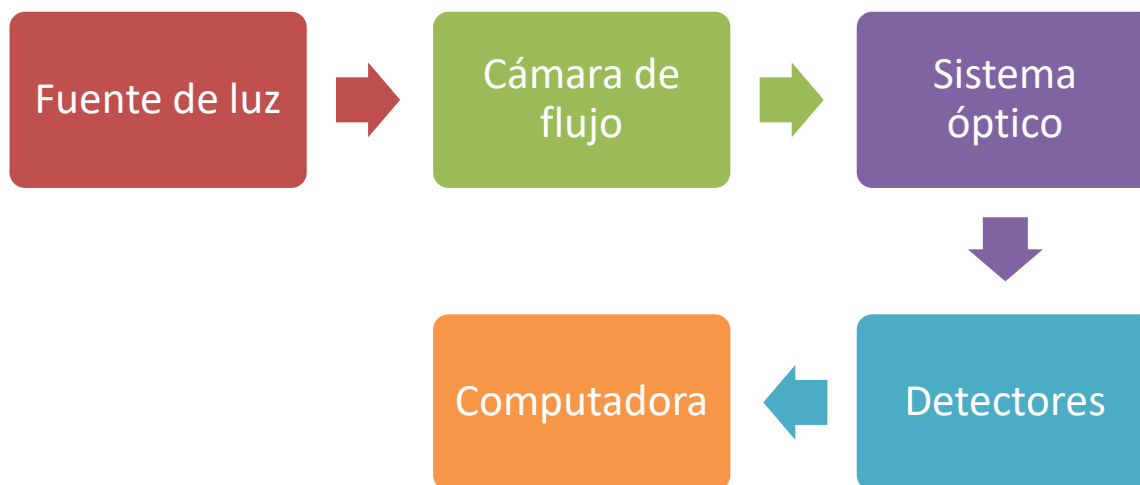


Figura 6. Diagrama general del funcionamiento de un citómetro de flujo



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	74 /108

Fundamento de la citometría de flujo

El principio en el que se basa esta tecnología es simple: se hacen pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una adelante de un haz luminoso. La información producida se agrupa en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula cuando se excitan por el rayo luminoso. Las señales luminosas que se producen se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que se procesan por una computadora^{3,5}.

Componentes del citómetro de flujo

La fuente de luz es un láser, una lámpara o un LED, actualmente la mayoría de los citómetros utilizan láseres ya que generan un haz de luz monocromático focalizado. Existen diversos láseres, el más utilizado es el de argón que produce una luz azul de 480 nm. Sin embargo, hoy en día en el mercado existen diversos citómetros, con más de un láser, entre más láseres tenga un citómetro, mayor es la gama de fluorocromos que se pueden analizar en la misma muestra⁵.

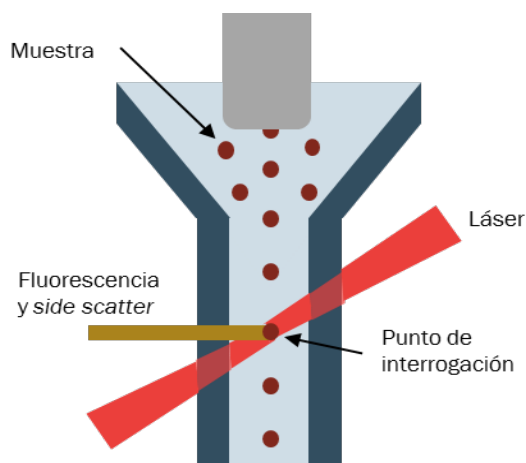


Figura 7. Diagrama de una cámara de flujo

La cámara de flujo está diseñada para hacer que las células pasen individualmente a través de un láser. Básicamente existen dos tipos de cámara de flujo: las que están completamente cerradas y las que una parte del flujo está expuesto, las primeras únicamente se utilizan para analizar la muestra mientras que las segundas permiten hacer separación celular conocida como cell sorting⁵.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	75 /108

El sistema óptico consiste en un arreglo de lentes, filtros, detectores y fotomultiplicadores dispuestos de tal forma que permiten detectar y analizar diferentes longitudes de onda, al igual que evitar la detección de longitudes de onda indeseadas.

Cada vez que una célula atraviesa el láser la luz se dispersa, la mayoría de los citómetros miden dicha dispersión, que depende del tamaño (forward scatter) y la complejidad (side scatter) de las células. Una vez adquiridos los datos, se representan a través de histogramas univariados para un solo parámetro, o a través de gráficas de puntos (dot plots), para representar dos parámetros. En un dot plot cada célula se representa por un punto⁵.

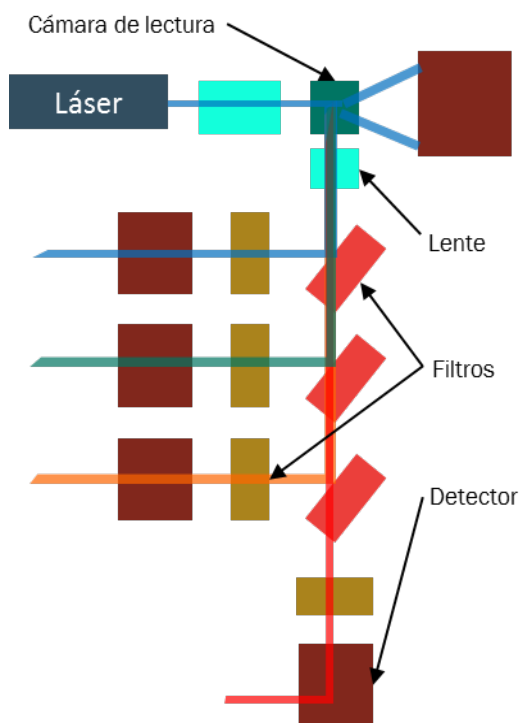


Figura 8. Esquema del sistema óptico de un citómetro de flujo

Para la tipificación de leucocitos por citometría de flujo se mezcla una suspensión de células con anticuerpos específicos acoplados a fluorocromos, que sirven para cuantificar la población de interés, posteriormente se adquiere la suspensión celular en el citómetro de flujo. Conforme las células pasan individualmente a través de una estrecha apertura, un láser excita los marcadores fluorescentes adheridos a las células, detecta la fluorescencia emitida y la registra en el equipo.

El fluorocromo ideal para la citometría de flujo debe ser biológicamente inerte, tener una gran intensidad de fluorescencia y un pequeño traslape en el espectro de emisión de otros fluorocromos⁶.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	76 /108

Debido a que no es posible seleccionar un filtro que únicamente detecte un fluorocromo, al realizar mediciones que requieren más de un marcador fluorescente se debe considerar el traslape en el espectro que pueden presentar cada uno de ellos. El traslape entre los espectros de emisión se puede eliminar utilizando un algoritmo, a este proceso se le conoce como compensación⁶.

Aplicaciones de la citometría de flujo

Las aplicaciones de la citometría son diversas: la cuantificación de linfocitos T cooperadores para monitorear el tratamiento y la evolución de la infección por VIH, identificar células tumorales y su actividad proliferativa, lo cual ayuda a establecer el pronóstico y determinar un tratamiento; la determinación de la compatibilidad de trasplantes, asilar cromosomas durante la construcción de librerías genéticas, separar espermatozoides con cromosoma X de los que contienen cromosoma Y para la selección de sexo en las fecundaciones *in vitro*^{7,8}, etc.

Las partículas biológicas que se han analizado por citometría son: embriones de *Drosophila*, nematodos adultos, islotes pancreáticos, organelos celulares, bacterias, liposomas, partículas virales, complejos inmunes, y moléculas como: proteínas, ácidos nucleicos y colorantes orgánicos⁷.

Existen diversas aplicaciones de la citometría de flujo a la investigación básica como la: microbiología, hematología, inmunología, citología, patología, biología celular y molecular, entre otros. Sin embargo, existen clasificaciones para dichas aplicaciones según el área específica en la que se utilice (Cuadro 1). La citometría de flujo se ha utilizado en el monitoreo del contenido de ADN, expresión fenotípica, flujo de calcio, proliferación y apoptosis. De manera simple es posible marcar cualquier molécula que sea de interés para su análisis en el citómetro de flujo siempre que se disponga de un anticuerpo acoplado a un fluorocromo o de compuestos fluorescentes que se puedan utilizar para que los detecte el citómetro de flujo. Afortunadamente, hoy en día la relación entre la aplicación básica y clínica es cada vez más



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	77 /108

estrecha lo que brinda la oportunidad a su vez a la aplicación diagnóstica, pronóstica y de tratamiento en múltiples enfermedades (Cuadro 2).

Cuadro 1. Parámetros que se pueden analizar por citometría de flujo³

Parámetros nucleares	Parámetros basados en ADN	Contenido de ADN Contenido de pares GC/AT Superenrollamiento de ADN Estructura de la cromatina Roturas de hebras de ADN Ploidía de ADN Ciclo celular Apoptosis-necrosis Cariotipo en flujo
	ADN + otros parámetros	ADN/ARN ADN/proteínas totales ADN/antígenos nucleares AND/antígenos celulares Regulación ciclo celular Ciclo celular de poblaciones específicas
	Parámetros no basados en ADN	Receptores nucleares Expresión de genes indicadores (reporteros) Morfología nuclear Componentes nucleares
Parámetros de superficie	Estructuras de la superficie celular	Receptores de superficie Sitios de unión a lectinas Densidad de superficie Pared celular
	Dinámica de la superficie celular	Unión de ligandos Transporte/internalización de ligandos Eflujo de solutos Exposición de receptores Potencial de membrana
Parámetros citoplasmáticos	Componentes intracelulares	Proteínas totales Proteínas estructurales Proteínas funcionales Glicoproteínas intracelulares Lípidos intracelulares Tioles libres
	Funciones intracelulares	Actividad enzimática Síntesis de proteínas Potenciales de membrana
	Entorno intracelular	Concentración de iones Movimiento de iones Lípidos y proteínas oxidados
Parámetros extracelulares	Dinámica de la secreción celular	Captura de proteínas secretadas Ensayos de cuantificación en suero



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	78 /108

	Activación celular Diferenciación celular
--	--

Cuadro 2 Aplicaciones generales de la citometría de flujo a la investigación básica³

Aplicación general	Parámetros sujetos de análisis	Información que proporciona
Inmuno fenotipación de superficie	Identificación de subpoblaciones celular mediante anticuerpos monoclonales	Linaje celular Estudio de maduración hematopoyética Implicación en la respuesta inmune Grado de activación celular
	Identificación de subpoblaciones celulares en la hematopoyesis	Diagnóstico y clasificación de enfermedades hematológicas Leucemias agudas y crónicas Linfomas Inmunodeficiencias Hemoglobinuria paroxística nocturna Detección de enfermedad mínima residual Enumeración de precursores hematopoyéticos CD34+ Diagnóstico de enfermedades congénitas plaquetarias Tromboastenia de Glanzmann Síndrome de Bernard-Soulier
Antígenos intracelulares	Detección de proteínas intracelulares con anticuerpos fluorescentes	Producción de citocinas intracelulares
	Fenotipo intracelular de leucemias y linfomas	Detección de células tumorales circulantes
	Expresión de reguladores del ciclo celular: ciclina D1	Cadenas ligeras de Ig intracelulares: κ y λ Antígenos de superficie que todavía no se expresan en superficie: CD3, CD22 Enzimas intracelulares
	Expresión de proteínas antiapoptóticas: BCL2, Rb	
	Expresión de proteínas supresoras de tumores: p53	
Antígenos circulantes	Análisis de citocinas intracelulares	Fenotipo Th0, Th1 y Th2
	Detección de autoanticuerpos circulantes	Anticuerpos antiplaquetarios Anticuerpos antineutrófilos
	Detección de aloanticuerpos circulantes	Pruebas cruzadas pretransplantes Uso de esferas recubiertas con moléculas específicas HLA
	Detección de anticuerpos unidos a células de sangre	



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	79 /108

Inmunoproliferación	Análisis monoparamétrico del ciclo celular	
	Análisis multiparamétrico del ciclo celular	
	Análisis de la historia de división celular	Contenido de ADN Fenotipo de superficie y contenido de ADN Contenido de ADN y antígenos relacionados con el ciclo celular Trazadores celulares y fenotipo de superficie

Determinación de subpoblaciones celulares en sangre periférica humana por citometría de flujo.

Material y reactivos.

Solución de lavado (PBS con 1% de albumina y 0.1 % de azida de sodio).

PBS

Solución fijadora

Micropipeta de volumen variable de 100 a 1000 µL.

Micropipeta de 1 µL.

Paraformaldehído al 1%.

Tubos para citometría

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Hielera

Sangre humana heparinizada.

Solución de lisis de eritrocitos.

Equipo

Centrifuga



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	80 /108

Citómetro de flujo FACS Aria II

Computadora con los programas Microsoft Excel y Flowing software

Agitador vortex.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento.

1. Obtener 5 mL de sangre periférica heparinizada (o con EDTA) y homogeneizar correctamente para evitar la coagulación de la muestra.
2. Rotular 7 tubos para citometría del número 1 al 7.
3. Adicionar 100 µL de sangre periférica a cada uno de los tubos.
4. Agregar a cada uno de los tubos 1 µL de cada uno de los anticuerpos como se describe a continuación.

<i>Tubo</i>	<i>Anticuerpo</i>
1	No se agrega nada (control de autofluorescencia)
2	Anti CD19 PE
3	Anti CD4 PerCP/Cy5.5
4	Anti CD56 APC
5	Anti CD8a PE/Cy7
6	Anti CD3 APC/Cy7
7	Anti CD19, Anti CD4, Anti CD56, Anti CD8a, Anti CD3

5. Agitar cada uno de los tubos e incubar las células durante 30-45 minutos a 4°C en la obscuridad.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	81 /108

6. Agregar 250 μ L de solución de lisis de eritrocitos comercial 1X (BD) incubar las células durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
7. Lavar las células con 1 mL de solución de lavado al 1%.
8. Agitar cada tubo con ayuda de un vortex y centrifugar las muestras a 700 gravedades durante 5 minutos, decantar el sobrenadante.
9. Repetir el paso 8
10. Resuspender el botón celular en 350 μ L de paraformaldehído al 1%.
11. Adquirir 10,000 eventos en el citómetro de flujo FACS Aria II (BD).
12. El análisis de resultados se llevará a cabo en los programas Summit v4.3, FACS Diva 6.1 o Flowing Software.

NOTA IMPORTANTE. Mantener las células teñidas protegidas de la luz para evitar que los fluorocromos pierdan su intensidad.

Resultados

Reportar la proporción de las principales poblaciones celulares del sistema inmune en sangre periférica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	82 /108

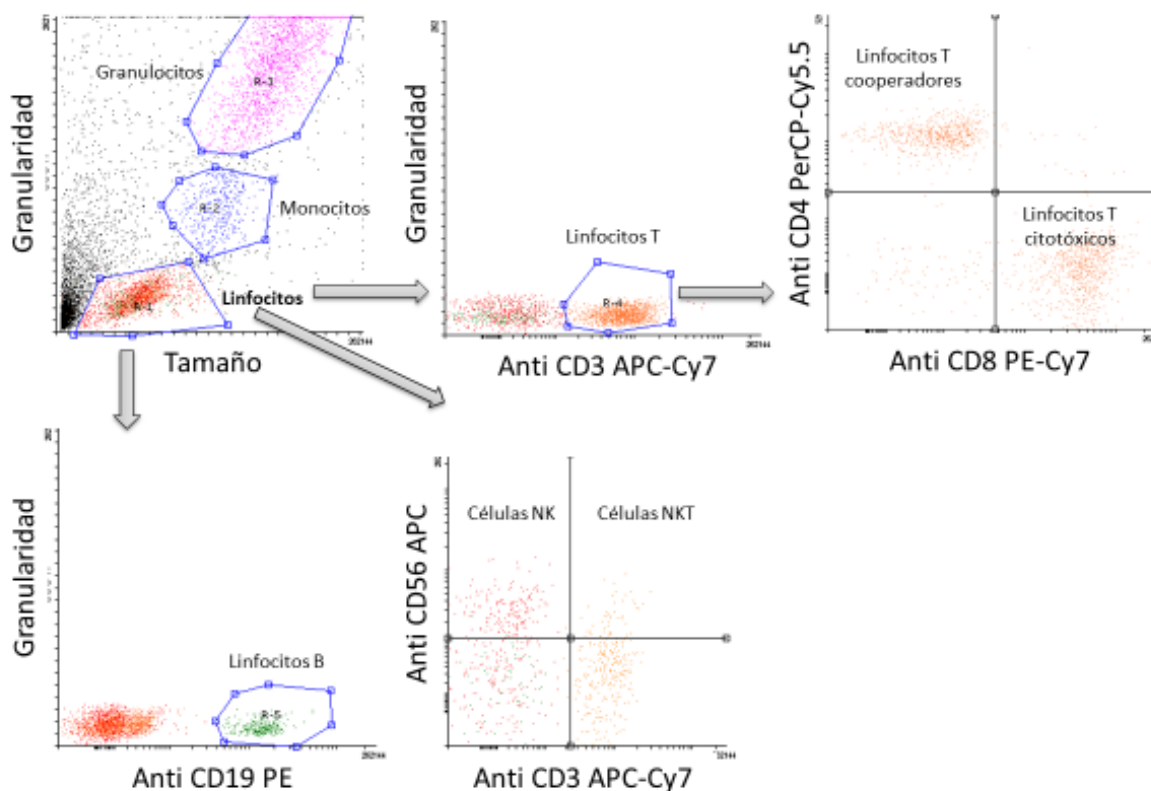


Figura 9. Imágenes representativas de las gráficas que se obtienen en la práctica derivadas del citómetro de flujo.

Determinación de subpoblaciones celulares en bazo de ratón por citometría de flujo.

Material y reactivos.

Malla de Nylon.

Micropipeta de 1 μ L.

Micropipeta de volumen variable de 100 a 1000 μ L.

Micropipeta de volumen variable de 20 a 200 μ L.

Tubos para citometría



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	83 /108

Cámara de Neubauer

Tubos Eppendorf de 1.5 mL

Hielera

PBS

Solución fijadora

Mezclas de tinción (A y B) con diluciones de anticuerpos monoclonales de ratón.

Amortiguador de tinción (PBS con 1% de albumina y 0.1 % de azida de sodio).

Solución de lisis de eritrocitos.

Equipo

Centrifuga

Microscopio

Citómetro de flujo FACS Aria II

Computadora con los programas Microsoft Excel y Flowing software

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.

Procedimiento.

1. Extraer el bazo de un ratón.
2. Macerarlo pasándolo por una malla de Nylon estéril con 5 mL de PBS frío.
3. Centrifugar las células a 2500 rpm durante 3 minutos.
4. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 1 mL de PBS.
5. Con la cámara de Neubauer ajustar la suspensión de las células a $1 \times 10^6/\text{mL}$
6. Tomar una alícuota de 50 μL y separar en 2 tubos Eppendorf (A y B).



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	84 /108

7. Fijar a las células.
8. Centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos, eliminar el sobrenadante y resuspender el botón en 50 μ L de amortiguador de tinción y mantener en hielo.
9. Adicionar 50 μ L de solución de tinción A y a la otra alícuota 50 μ L de solución de tinción B.
10. Incubar en hielo y proteger de la luz por 30 minutos.
11. Adicionar 100 μ L de solución fijadora de lisis 1X antes de la tinción y mezclar en vórtex durante 3 minutos.
12. Incubar durante 6 minutos en hielo.
13. Adicionar 1.0 mL de PBS frío.
14. Centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos.
15. Eliminar el sobrenadante y resuspender en 100 μ L de amortiguador de tinción.
16. Leer en el citómetro de flujo FACS Aria II 10,000 eventos, en su defecto almacenar en refrigeración y protegido de la luz.
17. Analizar los datos obtenidos con los programas FACS Diva o Flowing software

NOTA IMPORTANTE. Para realizar la compensación se requieren células de bazo y de cavidad peritoneal sin teñir, pero fijadas para ello seguir desde el paso 9. También se requieren tinciones simples en las que se deberá agregar cada anticuerpo en un tubo por separado en células de cavidad peritoneal (macrófagos, timo y bazo para Linfocitos T y B respectivamente) que provengan de un ratón normal. Es importante mantener las células teñidas protegidas de la luz para evitar que los fluorocromos pierdan su intensidad.

Resultados

Los resultados que se obtienen en el citómetro de flujo se pueden representar en diagramas de puntos denominados dot plot o en histogramas. Las regiones delimitadas en estos gráficos se



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	85 /108

separan con base en la intensidad de la fluorescencia, de esa forma se generan subgrupos denominados “gates”

El Forward Scatter (FSC) indica el volumen de la célula, mientras que el Side Scatter indica información sobre la complejidad como la presencia de núcleo y organelos. El citómetro de flujo permite adquirir el número de eventos que corresponde a la característica analizada. Para realizar las gráficas de complejidad (tamaño y granularidad en las células) se grafica FSC contra SSC (figura 4A) y se delimita la región en la que se encuentran las células de interés utilizando un control de células sin tinción. Posteriormente se crea un segundo dot plot en el que se grafica el marcador de la población de interés contra SSC (figura 4B), Si lo que se requiere es cuantificar subpoblaciones celulares, se construye una gráfica con el número de eventos positivos para los marcadores que diferencian las subpoblaciones de interés y se divide en cuadrantes en dónde se agrupan los eventos positivos para uno de los marcadores, dobles positivos y dobles negativos (figura 4C).

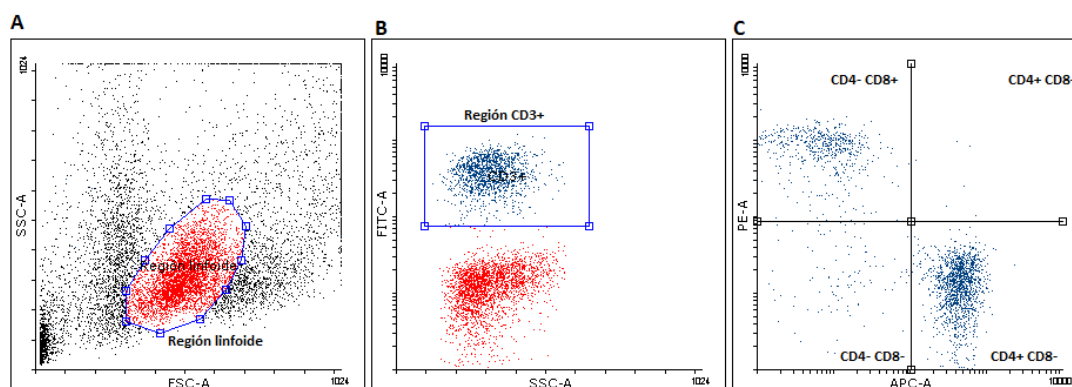


Figura 10. Inmunofenotipificación de células de bazo de ratón. A) Gráfico de tamaño vs granularidad, en donde se crea una región para seleccionar a la población linfocítica; B) Gráfico de granularidad vs CD3, donde se crea una región para seleccionar a las células CD3+; C) Gráfico de células CD4+ vs CD8+, para determinar el porcentaje de cada una de estas poblaciones

Manejo de residuos

- Las agujas utilizadas para la extracción de sangre deberán desecharse en el contenedor rojo para punzocortantes ubicado en el área de confinamiento de residuos.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	86 /108

- Los restos de sangre líquida o sus componentes serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración de 7% de cloro libre (porcentaje comercial). El hipoclorito de sodio se agregará a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.
- Los cadáveres de animales se depositan en la bolsa amarilla ubicada en el área de confinamiento de residuos.

Puntos guía de estudio.

- Fundamento de la citometría de flujo y sus aplicaciones.
- ¿Qué es una inmunotipificación y sus aplicaciones?
- En qué consiste una reacción antígeno-anticuerpo.
- ¿Qué son los fluorocromos y su uso en la citometría de flujo?
- ¿Cuáles son los diferentes sistemas que conforman un citómetro de flujo?
- ¿Cómo funciona un citómetro de flujo?
- ¿Cuál es la función del azida de sodio en los Ac?
- ¿Cómo se determina la concentración de anticuerpo adecuada para una tinción?
- Marcadores comúnmente utilizados para la determinación de células T (CD4+, CD8+), B, NK, NKT y monocitos y estrategias para su análisis.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	87 /108

Referencias bibliográficas.

1. Proserpio V, Piccolo A, Haim L, et al. Single-cell analysis of CD4+ T-cell differentiation reveals three major cell states and progressive acceleration of proliferation. *Genome biology*. 2016;17:103.
2. Schwab M, editor. *Encyclopedia of Cancer*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012. p. 689-92.
3. Barrera LM, Drago ME, Pérez J, et al. Citometría de flujo: Vínculo entre la investigación básica y la aplicación clínica. *Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias*. 2004;17:42-55.
4. Téllez L. Evaluación por citometría de flujo, del incremento en la tasa de apoptosis y necrosis en células HeLa tratadas con casiopeína: *Universiada Autónoma Metropolitana*; 2004.
5. Adan A, Alizada G, Kiraz Y, et al. Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical reviews in biotechnology*. 2016 Jan 14:1-14.
6. Baumgarth N, Roederer M. A practical approach to multicolor flow cytometry for immunophenotyping. *Journal of immunological methods*. 2000 Sep 21;243(1-2):77-97.
7. Shapiro H. *Practical Flow Cytometry*. 4th ed: Hoboken: John Wiley & Sons, Inc.; 2003.
8. Karabinus DS, Marazzo DP, Stern HJ, et al. The effectiveness of flow cytometric sorting of human sperm (MicroSort(R)) for influencing a child's sex. *Reproductive biology and endocrinology : RB&E*. 2014;12:106.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	88 /108

Práctica 12. Inmunocromatografía diagnóstica

Objetivo

Detectar un antígeno de interés diagnóstico mediante inmunocromatografía.

Fundamento teórico

En los últimos años, las técnicas inmunocromatográficas se han tornado populares debido a que ofrece ventajas que incluyen una alta sensibilidad analítica, fácil operación, rapidez en el diagnóstico, los reactivos son estables a temperatura ambiente y menor costo en comparación con otros métodos diagnósticos. Además, permite utilizar diferentes muestras como es sangre total, suero, plasma, orina, saliva y heces fecales. En conjunto, estas ventajas han dado como resultado el desarrollo de pruebas rápidas para distintas circunstancias clínicas. Así, las pruebas inmunocromatográficas se han utilizado para el diagnóstico rápido de enfermedades infecciosas como: dengue, hepatitis, *Helicobacter pylori*, influenza, leishmaniasis, malaria, *Taenium solium*, rotavirus, sífilis, tuberculosis y VIH. También se utiliza para la detección de drogas de abuso como canabinoides, anfetaminas y cocaína. Además, se han desarrollado pruebas para determinar antígenos tumorales, así como en análisis rutinarios como es el diagnóstico del embarazo. Asimismo, la prueba permite combinar ensayos para detectar más de un antígeno, por ejemplo existen pruebas rápidas para detectar VIH y sífilis o más de una droga de abuso.

La inmunocromatografía, también conocida como inmunoensayo de flujo lateral, se basa en la migración por capilaridad de una muestra que contiene el antígeno a ser detectado a través de una membrana que usualmente es de nitrocelulosa. El fundamento de la mayoría de las pruebas es similar al utilizado en el método de ELISA en sándwich con la única diferencia que la reacción se realiza en un papel cromatográfico por acción de la capilaridad. Para este sistema se utilizan dos anticuerpos específicos para el antígeno que se desea detectar; los



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	89 /108

anticuerpos van dirigidos contra distintos determinantes antigénicos. Uno de los anticuerpos se inmoviliza en la membrana, el otro es marcado con oro coloidal (conjugado) y se infiltra en la almohadilla donde se deposita la muestra. Cuando la muestra líquida se coloca por goteo en la almohadilla, el antígeno presente en la muestra hace contacto con el conjugado formando un inmunocomplejo que se mueve con la muestra por capilaridad hacia la almohadilla absorbente. En el trayecto, el inmunocomplejo hace contacto con el anticuerpo inmovilizado en la membrana, en consecuencia se forma otro inmunocomplejo que genera la formación de una línea colorida (roja) que indica la presencia del antígeno de interés en la muestra (zona de prueba). Si el antígeno no se encuentra en la muestra, entonces el conjugado migra solo a través de la membrana y no forma el inmunocomplejo con el segundo anticuerpo, por tanto sigue su camino hasta encontrar un tercer anticuerpo dirigido contra el conjugado, formando el inmunocomplejo que da origen a la línea colorida (zona de control). Debido a que la muestra es líquida, el movimiento por capilaridad es rápido y permite determinar la presencia o ausencia del antígeno en intervalos de tiempo menores a 15 minutos. En la figura 6, se esquematiza el proceso.

Además del oro coloidal que genera un color rojo en la prueba, se puede emplear látex que genera un color azul. Pruebas más novedosas utilizan fluorescencia o partículas magnéticas aunque tiene la desventaja de requerir un lector electrónico para obtener el resultado.

También existen ensayos inmunocromatográficos que tienen como fundamento un inmunoensayo competitivo. En este caso, en la prueba existe el antígeno o un análogo marcado con oro coloidal que compite con el antígeno presente en la muestra por los sitios de unión al anticuerpo que está fijo en la membrana. Por lo tanto, una muestra positiva al antígeno solo muestra la línea coloreada en la zona de control, mientras que una muestra negativa muestra dos líneas: una en la zona control y otra en la zona de prueba. Es común observar este tipo de ensayos en las pruebas de drogas de abuso.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	90 /108

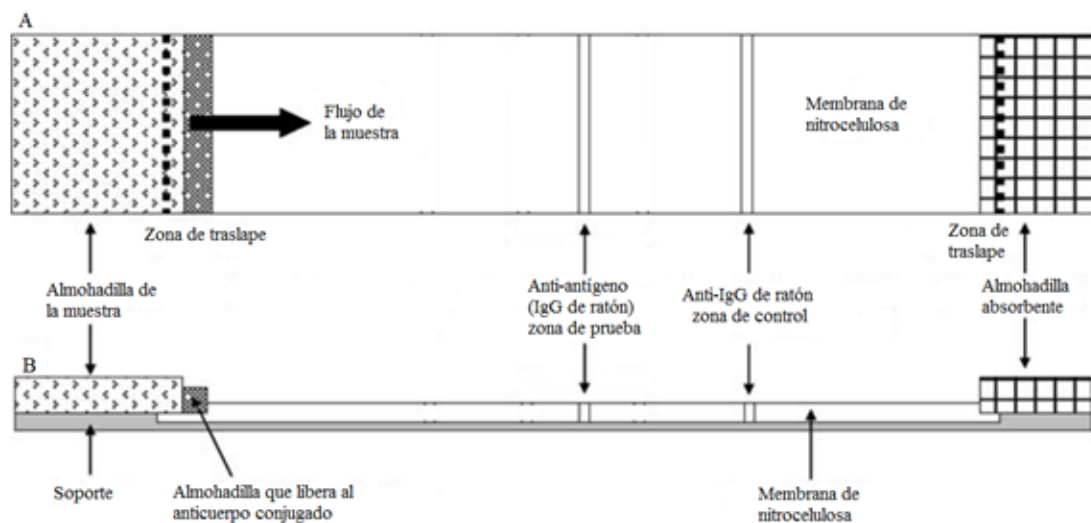


Figura 11. Diagrama que muestra los componentes principales de una prueba inmunocromatográfica.
A) vista superior; B) vista transversal. Modificado de Chang, *et al.*

Material y reactivos

Cronometro.

Gasa.

Prueba inmunocromatográfica (prueba rápida) para el diagnóstico de embarazo, VIH o drogas de abuso.

Pipeta Pasteur.

Suero u orina problema.

Equipo

Centrifuga clínica.

Servicios

Agua.

Energía eléctrica.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	91 /108

Procedimiento

1. Obtenga sangre por punción venosa y colóquela en un tubo sin anticoagulante.
2. Centrifugue la muestra a 3000 rpm por 5 minutos
3. Saque la prueba inmunocromatográfica del empaque.
4. Agregue 4 gotas de suero en la almohadilla de la muestra con una pipeta Pasteur o sumerja la almohadilla en la muestra. Esta instrucción varía de acuerdo con la prueba.
5. Tome el tiempo marcado en el inserto de la prueba, usualmente son 5 minutos.
Importante: no lea la prueba después del tiempo especificado o cuando esta se halla secado.

Resultados

Las pruebas inmunocromatográficas cualitativas se reportan como positivas o negativas. Si la prueba es de tipo sándwich los resultados se interpretan de acuerdo a la Figura 7. Si la prueba es de tipo competitiva: la prueba positiva se visualiza con la formación de una sola banda, mientras que la negativa se observa con la formación de dos líneas.

Manejo de residuos

- Las pruebas se desechan a la basura a la a basura municipal.
- La orina se desecha directamente en el drenaje.
- Los restos de sangre serán desinfectados utilizando una solución de hipoclorito de sodio con una concentración del 4 al 7% de cloro libre (porcentaje comercial); se agregará en una porción a la sangre líquida o sus componentes para alcanzar una concentración final de cloro libre del 0.4 al 0.7% manteniéndose de esta manera durante 30 minutos. Posteriormente, se verterá al drenaje.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	92 /108

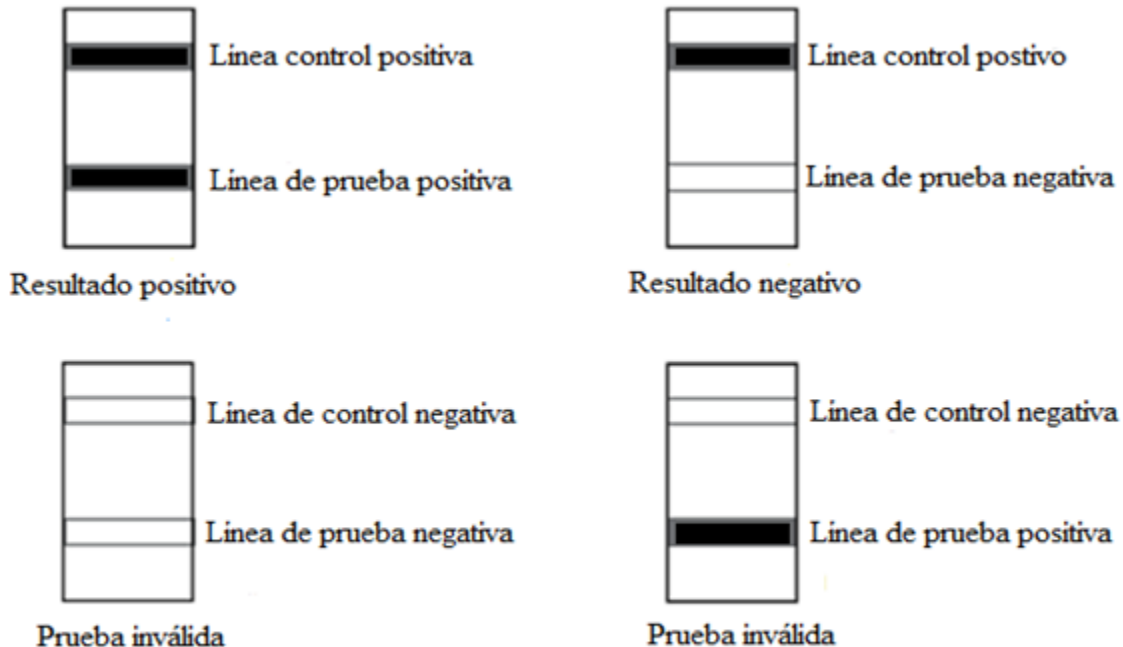


Figura 12. Interpretación de los resultados obtenidos de una prueba inmunocromatográfica de tipo sándwich.

Puntos guía de estudio.

- Técnicas de inmunocromatografía diagnóstica:
 - Fundamento de la inmunocromatografía,
 - Tipos de pruebas inmunocromatográficas: en sándwich, competitivo, en tira y en cassette.
 - Tipos de reveladores.
 - Inmunocromatografía cuantitativa.
 - Ejemplos de pruebas inmunocromatográficas que se realizan en el laboratorio clínico.
 - Interpretación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	93 /108

Referencias bibliográficas.

1. Ashihara Y, Kasahara Y & Nakamura RM. Inmunoensayos e inmunoquímica. En: McPherson RA & Henry JB, editores. El Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Vigésima edición. Madrid: Marban; 2007: p.821-849.
2. Chan CP, Cheung Y, Renneberg R & Seydack M. New Trends in Immunoassays. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* 2008; 109: 123-154.
3. Posthuma-Trumpie GA, Korf J, van Amerongen A. Lateral flow (immuno)assay: its strengths, weaknesses, opportunities and threats. A literature survey. *Anal Bioanal Chem.* 2009; 393(2):569-82.
4. Campbell S & Landry ML. Rapid Antigen Test. En: Tang YW & Stratton CW, editores. *Advances Techniques in Diagnostic Microbiology.* Segunda edición. New York: Springer; 2013: p.31-52.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	94 /108

Criterios de evaluación

- El Laboratorio de Inmunología Clínica corresponde al 40% de la calificación del módulo Inmunología Clínica
- El laboratorio se acredita con una calificación mínima de seis (6).
- No se guarda calificaciones para otro semestre o para examen extraordinario.
- El alumno deberá cumplir con el 80% de asistencias para poder ser evaluado, la asistencia se considera con los exámenes previos.
- El laboratorio está dividido en dos bloques de seis prácticas cada uno. El primer bloque consta de la practica 1 a la 6, mientras que el segundo está conformado de las practicas 7 a 12.
- Los alumnos que tengan un promedio menor a 8.0 en los exámenes previos de cada bloque, deberán presentar un examen de recuperación el cual será por bloques.

La calificación final del laboratorio se obtiene promediando los siguientes rubros para un total de 100%:

- ♦ **Requisito** individual (10%)
- ♦ **Examen** individual (60%)
- ♦ **Seminario** por equipo (15%)
- ♦ **Trabajo** en el laboratorio (5%)
- ♦ **Reporte** de la práctica, por equipo (10%)



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	95 /108

Características de cada Rubro

- ♦ **Requisito** (individual) entregar uno de los siguientes documentos manuscrito (a mano): mapa conceptual o cuadro sinóptico del tema de la práctica; **debidamente elaborado** en una cuartilla; colocando en el extremo superior derecho un recuadro con nombre y número de equipo. Se entrega al asesor al inicio de la práctica.
- ♦ **Examen** (individual) el examen se elabora con base en el método, fundamento y contenidos (puntos guía) que los asesores entregan al inicio del semestre.
- ♦ **Seminario** (por equipo) consta de un trabajo escrito y la exposición. La exposición se realiza durante la sesión práctica deben participar todos los integrantes del equipo, explicando los contenidos (no leyendo la información y cuidar incluir imágenes, cuadros sinópticos, etc.); el trabajo escrito debe contener: introducción, desarrollo del tema y referencias (se sugiere elaborar primero el trabajo y de ahí tomar la información para la exposición) el trabajo se entrega al asesor el día del seminario.
Conjuntar todos los seminarios en un CD (quemar 4 CD, uno para cada profesor) se entregan el día que se informa el promedio final de exámenes.
- ♦ **Trabajo en el laboratorio** (se califica por equipo) evaluando: trabajo colaborativo, normatividad, organización, responsabilidad y limpieza.
Bitácora por equipo consta de una libreta exclusiva para el laboratorio en ella se incluye por práctica: título de la práctica, objetivo, diagrama del método, pesadas, cálculos, resultados, notas y comentarios que se generen durante el trabajo de laboratorio. **Nota la bitácora no sale del laboratorio.** Se califica como parte del trabajo en el laboratorio.
- ♦ **Reporte** se realiza por equipo y se entrega una semana después de concluir la práctica (tener resultados completos) se elabora con base en el siguiente protocolo.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	96 /108

Protocolo para elaborar el reporte:

CONTENIDO	VALOR
Carátula. Debe contener el nombre de todos los integrantes del equipo que participaron en su elaboración y su firma de aprobación.	
Introducción. Debe ser una introducción de la práctica correspondiente y no únicamente de aspectos teóricos relacionados con el tema.	1 punto
Objetivo y diagrama del método. Puede ser de flujo o de otro tipo de diagrama (elaborar un diagrama no significa poner el método en cuadros)	1 punto
Resultados. Debe incluir los resultados de todo el grupo preferentemente empleando gráficas o cuadros (con la información necesaria para ser auto explicativas)	2 puntos
Análisis de resultados. Hacer un análisis y no sólo una descripción de resultados.	3 puntos
Conclusiones. Deben ser concretas y estar relacionadas con los resultados con el análisis de resultados y con el objetivo de la práctica.	2 puntos
Referencias. Deben incluir cuatro referencias como mínimo escritas con base en los criterios de Vancouver.	1 punto
Total	10 puntos

Importante No se aceptara ningún reporte si le falta algún contenido. Si el reporte contiene la misma información en alguno de los rubros que la información de otro equipo y sólo cambia el formato ambos reportes tienen cinco de calificación.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	97 /108

Incluir en la carátula el siguiente cuadro de evaluación de reporte:

Evaluación de reporte

CONTENIDO	VALOR ESTIMADO	VALOR OBTENIDO
Carátula		
Introducción	1 punto	
Objetivo y diagrama de la práctica de flujo o de otro tipo	1 punto	
Resultados	2 puntos	
Análisis de resultados	3 puntos	
Conclusiones	2 puntos	
Referencias	1 punto	
Total	10 puntos	

Bitácora, características y lineamientos para su uso.

La bitácora debe ser de pasta gruesa, sin espiral para no perder hojas con información relevante, el tamaño puede ser forma francesa o profesional a elección del equipo; todas las hojas deben foliarse (numerarse), debe estar forrada, presentar en la pasta etiqueta de identificación, y en el costado derecho pestañas o separadores numerados, que indiquen en donde empieza una práctica. Todos los registros se hacen con tinta, si se pega material como gráficas no usar grapas, no dejar hojas en blanco sin cancelar, los errores o cancelaciones se tachan con una línea diagonal y en seguida se registra el dato correcto y las iniciales o firma de quien cancelo.

Secciones de la bitácora

- Portada incluye: facultad, carrera, módulo, equipo, integrantes.



SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	98 /108

- Registros Todos los registros se hacen con tinta (no usar plumas de gel) incluye cálculos, pesadas, notas, resultados, gráficas e información relevante para la práctica.

Reglamento del laboratorio

- Durante la práctica los alumnos deberán portar una bata blanca larga, de manga hasta el puño y deberá estar abotonada.
- Los alumnos deberán calzar zapatos cerrados con suela antiderrapante.
- Se prohíbe fumar, comer o beber dentro del laboratorio, así como el uso del teléfono celular.
- Se prohíbe jugar dentro del laboratorio.
- Se prohíbe utilizar el celular para jugar, escuchar música o ver redes sociales.
- En caso de tener el pelo largo, deberán recogerlo.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	99 /108

Anexos

Anexo 1. Soluciones

Solución salina 0.85 %

0.85 g. de NaCl en 100 mL de agua destilada.

Preparación del sulfato de amonio saturado

Pesar 1000 g de sulfato de amonio en aproximadamente 1 litro de agua destilada, calentada a 50 °C, hasta que la sal se disuelva. Se deja a temperatura ambiente toda la noche y se ajusta el pH a 7.2 con NaOH 2N.

Solución salina amortiguada pH 7.4 (SSA)

Solución A:

NaCl.....8.0 g

KCl.....0.4 g

MgSO₄•7H₂O.....0.2 g

Na₂HPO₄.....0.045 g

KH₂PO₄.....0.060 g

Disolver en 500 mL de agua destilada

Solución B:

CaCl₂•2H₂O.....0.147g

Disolver en 500 mL de agua destilada

Solución C:

Glucosa.....1.0 g

Disolver en 10 mL de agua destilada y mezclar con 1000 mL de partes iguales de las soluciones A+B

Solución D:



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	100 /108

Rojo de fenol.....0.002 g

Disolver en 10 ml de agua destilada y añadir a la mezcla A+B+C

Solución E:

Tris.....19.1 g

Disolver en 800 mL de agua destilada y ajustar a pH 7.4 con HCl. Aforar a 1000 mL con agua destilada

Solución de trabajo: mezclar volúmenes iguales de la solución E y de la mezcla A+B+C+D, y reajustar el pH a 7.4 si es necesario

Solución Alsever

Glucosa.....20.50 g

Citrato de sodio•2H₂O.....8.0 g

Ácido cítrico (H₂O).....0.55 g

Cloruro de sodio.....4.20 g

Agua destilada1000 mL

Esta solución se esteriliza en autoclave a 10 libras durante 15 minutos. La sangre de carnero se recibe en esta solución volumen a volumen, se mantiene en refrigeración hasta 4 semanas para su uso.

Solución reguladora de TBS: (Triethanolamine Buffered Saline)

NaCl.....7.5 g

MgCl₂•6H₂O.....0.1 g

CaCl₂•2H₂O.....0.022 g

Trietanolamina.....2.8 mL

Agua destilada800 mL



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	101 /108

Disolver las sales anteriores en 800 mL de agua destilada y agregar ácido clorhídrico 1.0 N suficiente para ajustar el pH 7.4 y aforar a 1000 mL con agua destilada, y agregar gelatina a concentración final de 0.05 %.

Solución de Hanks

Glucosa.....1.0 g
NaCl.....8.0 g
KCl.....0.4 g
MgSO₄.....0.1 g
MgCl₂.....0.1 g
KH₂PO₄.....0.06 g
Na₂HPO₄.....0.06 g
NaHCO₃.....0.35 g
Rojo de fenol:.....0.02 g
Agua bidestilada.....1000 mL

Esterilizar en autoclave 10 libras durante 15 minutos.

Solución PBS (Buffer salina fosfatos)

NaCl.....8.0 g
KH₂PO₄.....0.2 g
Na₂HPO₄•12H₂O.....2.9 g.
KCl.....0.2 g.
Agua bidestilada.....1000 mL

Solución PBS-Tween

A un litro de solución PBS, se le agrega 0.5 mL de tween 20.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	102 /108

Solución amortiguador de recubrimiento. Carbonato-bicarbonato pH 9.6

Na_2CO_31.59 g:

NaHCO_32,93 g

Solución de PBS.....1000 mL

Se debe preparar al momento.

Solución de sustrato de peroxidasa de rábano picante

Solución A: Ácido cítrico 0.1M.....2.1014 g

Disolver en 100 mL de solución PBS.

Solución B: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.2M.....2.8392 g

Disolver en 100 mL de solución PBS

Se mezcla 48.6 mL de solución A + 51.4 mL de solución B

Agregar 40 mg de o-fenilendiamina y 40 μL de peróxido de hidrógeno al 30%, preparar antes de usarlo pues lo daña la luz

Solución de bloqueo para ELISA

Albúmina sérica bovina al 1%

Leche descremada al 5%

Disuelva en solución PBS

Solución salina citratada

Cloruro de sodio.....0.85 g

Citrato de sodio.....0.4 g

Disolver en 100 mL de agua destilada. Mantenerla en refrigerador, debe usarse fría.



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	103 /108

Solución MEM (medio esencial mínimo)

Se disuelve en agua destilada la cantidad indicada por el fabricante, este medio se utiliza para cultivo de linfocitos al igual que RPMI 1640, 199, etc.

Solución de Krebs-Henseleit, pH 7.4

NaCl (0.154M).....100 mL.

KCl (0.154 M).....4 mL

CaCl₂ (0.11 M).....3 mL

KH₂PO₄ (0.154 M).....1 mL

MgSO₄. 7H₂O (0.154 M).....1 mL

Glucosa.....250 mg/130 mL

NaHCO₃.....21 ml (3.25 g/250 mL).

Dejar 12 mL del bicarbonato sin burbujear, el resto de bicarbonato se burbujea 20 minutos con CO₂. Se ajusta el pH a 7.4 con el CO₂ sin burbujear y se completan las 21 partes con el CO₂ burbujead.



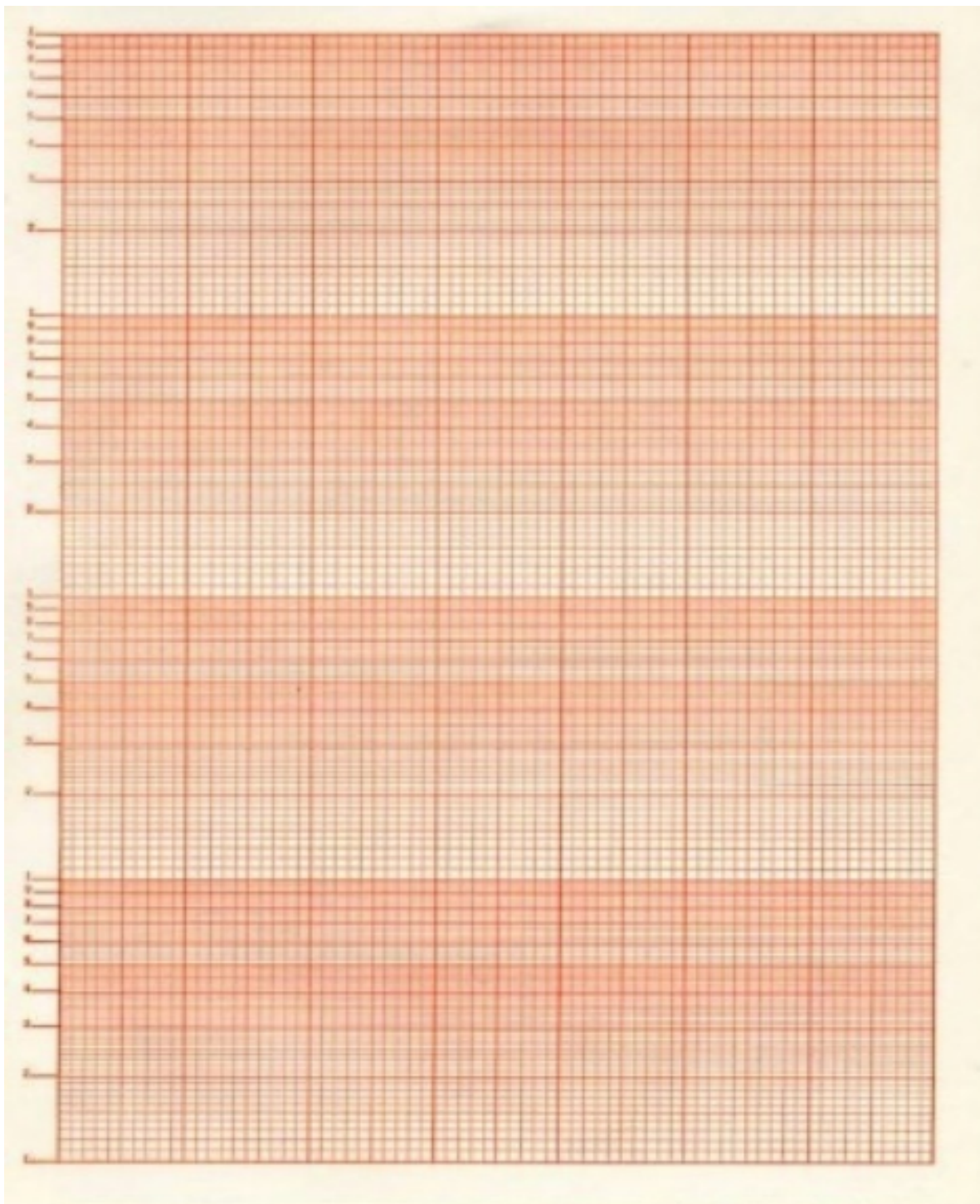
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS
LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	104 /108

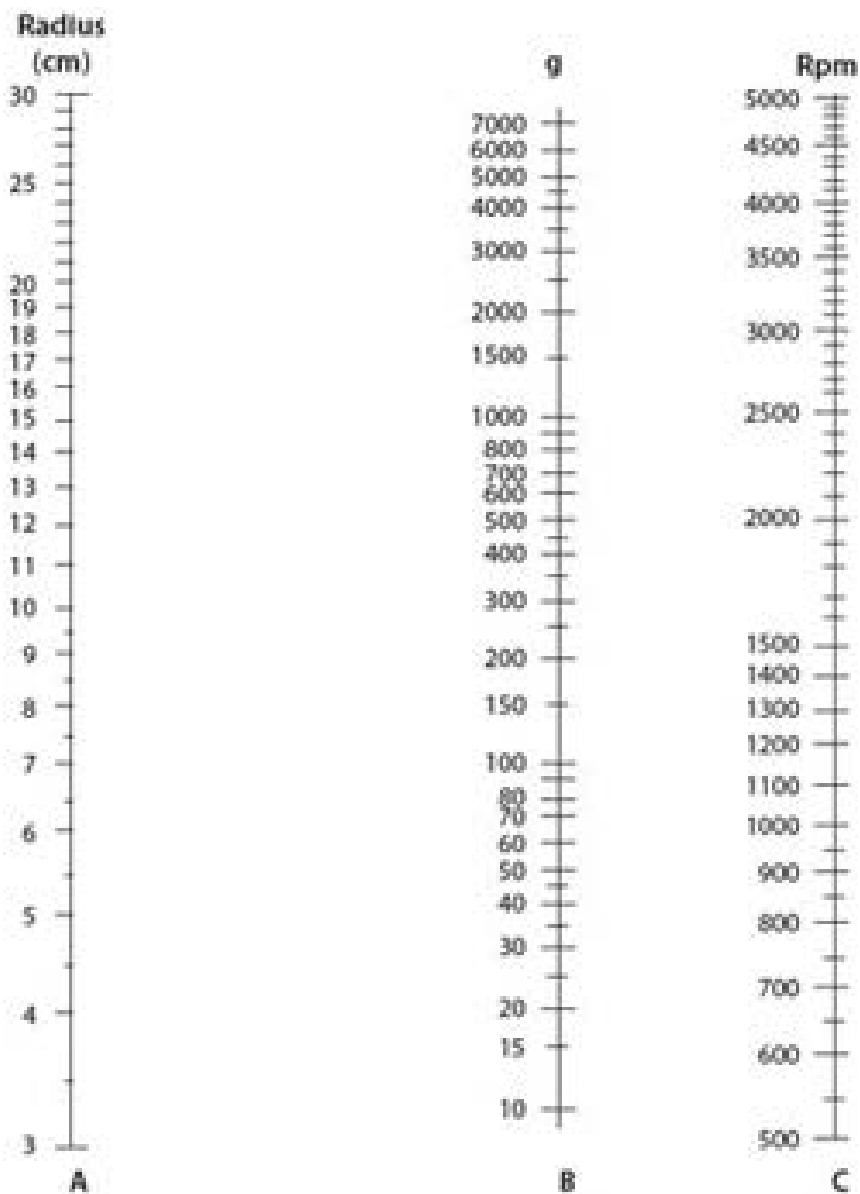
Anexo 2. Papel semilogarítmico de tres ciclos.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	105 /108

Anexo 3. Nomograma para convertir revoluciones por minuto a gravedades.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	106 /108

Anexo 4. Lista de materiales necesarios por equipo.

- Equipo Vacutainer para extracción sanguínea (Camisa, ligadura, torundas con alcohol al 70%).
- Tubos para Vacutainer de heparina, EDTA y sin anticoagulante.
- Tubos de vidrio de 13x100 y de 18x150 (20 de c/u, de preferencia PYREX)
- Jeringas de 1, 3, 5 y 10 mL (por lo menos 3 jeringas de cada volumen) y 1 jeringa de 20 mL.
- Asa bacteriológica (para la práctica 2).
- Lápiz diamante (uno por equipo).
- Capilares sin heparina (un paquete por equipo).
- Plastilina (un paquete por equipo).
- Pipetas graduadas de 1, 2 y 5 mL,
- Vasos de precipitado 200 o 250 mL.
- Probetas
- Portaobjetos y cubre objetos.
- Bata limpia y guantes.
- Gasas.
- Gradilla.



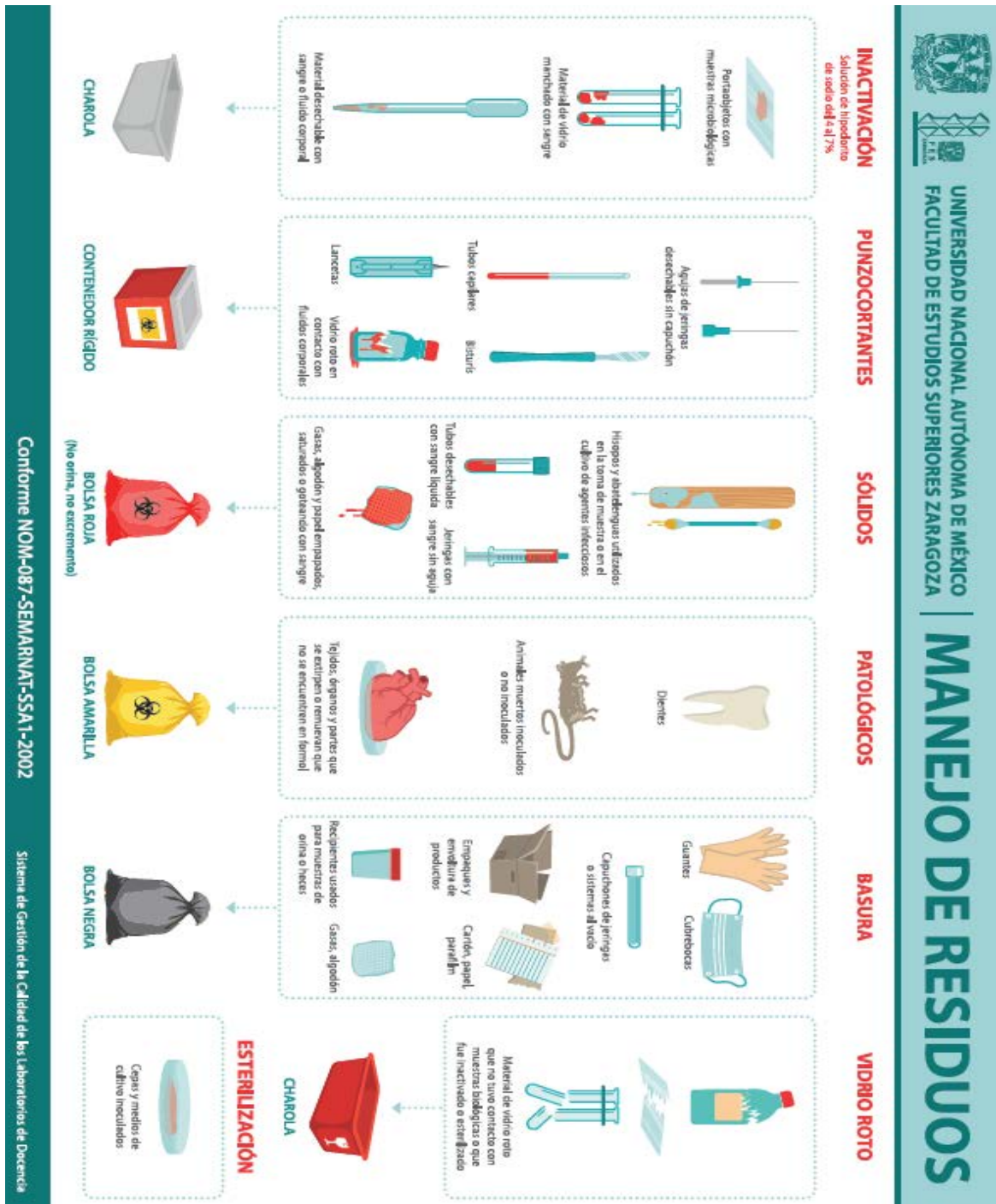
SISTEMA DE GESTIÓN DE LA CALIDAD DE LOS LABORATORIOS DE DOCENCIA

MANUAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA



Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	107 /108

Anexo 5 Manejo de residuos.





Código	Fecha de elaboración o revisión	Versión	Página
SGC-FESZ-QFB-ML24	09/12/2019	1	108 /108

Anexo 6. Identificación de residuos químicos.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

RESIDUOS QUÍMICOS



1 Envásalos correctamente
NO pet, NO contenedor de alimentos

2 Etiquétalos y anota todos los rubros

3 Colócalos en el área identificada para Residuos Químicos

Sistemas de Gestión de la Calidad de los Laboratorios de Docencia

ETIQUETA DE RESIDUOS QUÍMICOS

Nombre del generador: _____

Nombre del reactivo o mezcla: _____

Concentración y/o cantidad: _____

Nombre de la reacción o análisis: _____

Unidad / Carrera / Semestre / Grupo _____

Edificio / N° de Laboratorio: _____

Fecha: _____

Marcar con una X lo que corresponda

☒ Corrosivo ☒ Inflamable ☒ Tóxico ☒ Reactivo ☒ Explosivo

Sistema de Gestión de la Calidad de los Laboratorios de Docencia 2016