



GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

INMUNOLOGÍA CLÍNICA

2009

PROFESOR RESPONSABLE:
Mg en Inmunología Graciela R Svibel de Mizdraji

PLANTEL DOCENTE DE LA ASIGNATURA

Bioquímica Graciela Ruth Svibel de Mizdraji

Mg en Inmunología

Profesora Adjunta a cargo de Inmunología Clínica

Bioquímica Susana Soto de Ferrini

Mg en Inmunología

Jefe de Trabajos Prácticos

Bioquímico Héctor Marcelo Marín

Jefe de Trabajos Prácticos

Alumna Elisa Beraja

Ayudante Alumno

Alumna Pierina Catelli

Ayudante Alumno

Alumna Cecilia Urquijo

Ayudante Alumno

Alumno Mauricio Martínez

Ayudante Alumno

Bioquímica Fernanda Bassana

Bioquímica Andrea Paniagua

Alumno Emiliano Sotelo

Colaboradores

INMUNOLOGÍA CLÍNICA

Año 2009

Al lector:

Seguramente habrás escuchado hablar de temas de tanta actualidad como SIDA, cáncer, alergia, estrés, trasplantes e inmunosupresión, entre otros. O de conceptos nuevos como los factores de transferencia y otros no tan nuevos, pero no por ello menos importantes, como la vacunación. Tanto el origen de muchas de estas patologías como las estrategias de la medicina moderna o tradicional están íntimamente ligados a la función o disfunción de un sistema altamente eficiente, “EL SISTEMA INMUNE”.

Como alumno de la Carrera de Bioquímica y futuro profesional integrante de un equipo de salud es fundamental que adquiera conocimientos sobre este SISTEMA, su funcionamiento básico, sus componentes, sus mecanismos de interacción y las estrategias que a lo largo de la historia hombres y mujeres de ciencia han diseñado para modularlo.

¿Qué es el SISTEMA INMUNE?

Es un sistema altamente eficiente responsable de la resistencia frente a los diferentes agentes infecciosos y del mantenimiento de la homeostasis del medio interno. La compleja red de interacciones que involucra moléculas, células y tejidos que lo constituyen está finamente regulada y su estimulación conduce a la activación de diversos mecanismos efectores.

¿Cuáles son los objetivos del curso de INMUNOLOGÍA CLÍNICA?

Brindar al alumno los conocimientos básicos generales para introducirlo en la disciplina. A continuación, los conocimientos acerca de cómo está constituido el Sistema Inmune (SI): órganos, tejidos, células (anatomía del SI); cómo interaccionan y

funcionan las células, moléculas de las superficies celulares y solubles: marcadores y citoquinas (fisiología del SI).

Estudiar con un enfoque más profundo los aspectos moleculares durante el desarrollo de la Respuesta Inmune (RI) frente a los agentes extraños: bacterias, virus, hongos, parásitos, lo que permitirá integrar estos conocimientos con los adquiridos en otros cursos. Finalmente impartir los conocimientos sobre Inmunopatología.

Entrenar al alumno, previa fundamentación, en la realización de las principales técnicas empleadas en inmunología, tanto “*in vitro*” como “*in vivo*” que permiten evaluar y caracterizar la respuesta inmune, completando así el Inmunodiagnóstico.

¿Qué se incluye en los TRABAJOS PRÁCTICOS?

Algunas metodologías que los inmunólogos han diseñado para evaluar y caracterizar la respuesta inmune. Sin embargo, en la actualidad, muchas de ellas no sólo son utilizadas para este fin, sino que su uso se ha extendido a distintas áreas de la ciencia.

Durante el desarrollo de los mismos estudiaremos algunas de las metodologías de uso frecuente en el laboratorio inmunológico, profundizando acerca de sus fundamentos, discutiendo conceptos fundamentales como la especificidad y sensibilidad. Analizaremos las ventajas y desventajas de cada metodología y sus diferentes aplicaciones.

Debido a la especificidad de la respuesta inmune, la interacción entre un antígeno y un anticuerpo *in vitro* es utilizada con fines de diagnóstico para la identificación de antígenos o anticuerpos.

En la interacción *in vitro* de un antígeno con su correspondiente anticuerpo se distinguen dos etapas:

- a) Una primera etapa rápida, llamada “**interacción primaria**” que está regida por leyes fisicoquímicas y que resulta **no visible** al observador. En este caso se han desarrollado metodologías para visualizarlas: antígenos o anticuerpos son unidos covalentemente a distintos marcadores en un proceso denominado conjugación. Cuando el marcador utilizado es un **isótopo radiactivo**, la técnica se denomina **radioinmunoanálisis (RIA)**, si se trata de un **fluorocromo**, la técnica se conoce como **inmunofluorescencia (IF)** y si se trata de **enzimas** las técnicas derivadas son

enzimoinmunoanálisis (EIA o ELISA), **inmunotransferencia** o **inmunocitoquímica**.

- b) Una segunda etapa, llamada **“interacción secundaria”**, lenta, dependiente de la concentración de electrolitos y de la temperatura, que está regida por las leyes de interacción coloidal y se manifiesta con la **aparición de un fenómeno visible como por ejemplo la precipitación o aglutinación**.
- c) Cuando la interacción antígeno – anticuerpo ocurre in vivo, se producen fenómenos biológicos colaterales tales como necrosis (reacción de Arthus) o fenómenos vasógenos o de contractura de la musculatura lisa (anafilaxia) y estas manifestaciones se conocen como **“interacciones terciarias”**.

¿Cuáles son las distintas etapas de un estudio paraclínico?

- **Etapa preanalítica:** registro de datos, recolección preparación y conservación de la muestra....
- **Etapa analítica:** manejo de la muestra, bioseguridad, calidad operacional, control de calidad interno y externo...
- **Etapa postanalítica:** registro, interpretación y validación de los resultados; expresión de los resultados, expresión de los valores de referencia.

NOS COMUNICAMOS.....

A lo largo del tiempo tanto el proceso de aprendizaje como el proceso de enseñanza han avanzado hacia nuevos espacios en búsqueda de mejores metodologías y nuevas estrategias de educación.

Pretendemos generar un canal de comunicación más directo entre docente y alumno. Por ello, sólo nos queda contagiarnos nuestro entusiasmo.....

Por ello, tratando de agilizar las comunicaciones, les contamos que disponemos de una página web en internet, <http://exa.unne.edu.ar/depar/areas/bioquimica/inmunoclinica>, en la que podrán encontrar toda la información de la asignatura.

BIENVENIDOS

PLANTEL DOCENTE DE INMUNOLOGÍA CLÍNICA

- Bioquímica Graciela R Svibel de Mizdraji: gmizdraji@arnet.com.ar
- Bioquímica Susana M Soto de Ferrini: susanaferrini@yahoo.com.ar
- Bioquímico Héctor M Marín: marin_marcelo@hotmail.com
- Elisa Beraja: eliber936@hotmail.com
- Pierina Catelli: pieryac@hotmail.com
- Cecilia Urquijo: maceciliaurquijo@hotmail.com
- Mauricio Martínez: mauriam01@hotmail.com
- Andrea Paniagua: andrea_laura_paniagua@hotmail.com
- Emiliano Sotelo: jesr5@hotmail.com



¿CÓMO REALIZAR UNA BÚSQUEDA BIBLIOGRÁFICA EN INTERNET?

El alumno debe buscar información sobre vacunas para hepatitis B

Primera parte: Búsqueda en internet sobre información sobre vacunas.

1) Ingrese en la página <http://www.guiadevacunacion.com.ar/>

Haga click en enfermedades. Seleccione *hepatitis B*. Allí encontrará información respecto al agente etiológico, epidemiología, clínica, etc de la enfermedad. Haga click en *vacunas*. Allí encontrará información sobre los tipos de vacunas usadas para hepatitis B. Ingrese en *marcas*.

2) Ingrese en *calendarios de vacunación* y compare el calendario de Argentina y de algún país Europeo, de centro América, EEUU.

3) Ingrese a *Viajeros*. Identifique las vacunas necesarias para viajeros que se dirigen a África, Asia, EEUU, etc.

4) Ingrese a la página <http://www.aepap.org/index.htm>. Ingrese a vacunas. Ingrese a Inmunizaciones en situaciones clínicas especiales.

5) Ingrese a <http://www.worldwidevaccines.com>. Ingrese a Public site. Ingrese a enfermedades, a vacunas, por país, etc.

6) Ingrese a la página <http://www.childrensvaccine.org>. Haga click en Diseases and vaccines. Ingrese en Hepatitis B.

7) Ingrese a otras páginas citadas en la guía de trabajos prácticos.

Segunda parte: Búsqueda en internet sobre trabajos de investigación científica.

8) Ingrese a la página <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query>

En la misma usted encontrará la posibilidad de buscar (search) en **PubMed**, Protein, nucleotid, structure, Books, Journals, etc

Seleccione **PubMed**.

Busque publicaciones utilizando la palabra "*vaccines*". Observe cuántos artículos encontró en su búsqueda.

Respuesta:

Realice una búsqueda con las *palabras "vaccine (espacio) hepatitis B (espacio) review"*

Observe cuántos artículos encontró en su búsqueda.

Respuesta:

9) Realice una búsqueda de los trabajos publicados por el autor: **Koff RS**. Recuerde que para la búsqueda debe colocar el apellido y las iniciales.

¿Cuántos trabajos ha publicado?

Respuesta:

10) Busque el e-mail del autor y escríbale un mail solicitándole que les envíe vía mail o por correo regular una copia de su artículo.

To: dirección de e-mail

Subject: Asking for a reprint

Dear Dr Koff Rs,

Could you please send me a PDF file of your manuscript: xxxxxxxx” published in xxxxxxxx.

Thanks you very much

Firma y dirección completa.

11) Busque el artículo publicado por el autor Koff RS en la revista: *Int J Parasitol.* 2003 May; 33(5-6):517-23. Hepatitis vaccines: recent advances.

Ingrese a Elsevier full text article.

12) Haga click en PDF y descargue el artículo para su impresión con el programa Acrobat reader.

13) En Pubmed y en el mismo artículo ingrese en el cuadro Related articles.

14) Ingrese a la página <http://www.biblioteca.secyt.gov.ar>. Haga clic en Biológicas y salud. Haga clic en Inmunología. Haga clic en la revista vaccines. Busque en quick search *hepatitis B vaccine* y en *This journal*.

Podrá así acceder a los artículos publicados en esta revista de ese tema y podrá bajar los PDF files e imprimir o guardar en diskett. Practique ingresando a otras revistas.

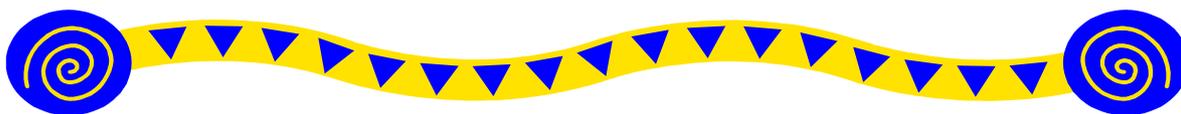
15) Ingrese por la página principal a *Books* y busque el libro *Immunobiology*.

Ingrese a algún capítulo del libro y copie y pegue alguna figura. Por ejemplo ingrese a *mucosal immune system* y figura 1.17.

16) Ingrese a la página www.jimmunol.org e ingrese en current issue, select an issue from the archive, Search for articles etc.

17) Ingrese a la página www.jem.org e ingrese en View future articles, select an issue, etc. Ingrese en *Instructions for authors*.

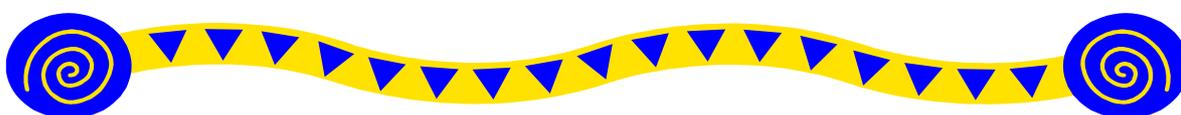
18) Realice una búsqueda de un tema en particular que sea de su interés. Busque un *review* y un *artículo*.



MANUAL DE PROCEDIMIENTOS
PARA LABORATORIOS DE
DIAGNÓSTICO

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

INMUNOLOGÍA 2009



INTRODUCCIÓN

Las medidas de bioseguridad tienen como finalidad evitar que como resultado de la actividad asistencial se produzcan accidentes. De allí que tanto en el orden nacional como en el provincial, se deben implementar legislativamente cuales son los resguardos que deben adaptarse en las diferentes prácticas médicas.

Se trata de medidas que operativamente tienden a proteger tanto al paciente como al personal de salud y su utilización tiene carácter obligatorio. Es por ello, que los profesionales y personal auxiliar deben demandar el suministro de los elementos necesarios a los responsables de las instituciones de salud, pudiéndose negar a desarrollar sus tareas, si carecen de ellos.

El solo incumplimiento de las normas de bioseguridad trae aparejado sanciones administrativas; y si como producto de dicha mala práctica se produce el contagio del virus HIV se origina una responsabilidad civil y penal. La responsabilidad de tal negligencia recaerá, según sea el caso, en el personal actuante, en la dirección técnica, en los directivos o propietarios de los establecimientos, en las obras sociales y en las autoridades instituidas legislativamente para controlar el cumplimiento de las precauciones exigidas.

(Texto de la Organización Panamericana de la Salud)

El personal de laboratorio que maneja material biológico potencialmente contaminado con HIV, u otros agentes de enfermedades transmitidas por sangre, como los virus de la HEPATITIS B (HBV), C (HCV) y HTLV, además de CHAGAS, BRUCELOSIS, etc., están expuestos a accidentes que pueden poner en riesgo su salud. Las normas de bioseguridad están destinadas a proteger al personal de este tipo de accidentes. Además de ello existen distintas normas legales vigentes tendientes a asegurar una mejor calidad de vida, llevar adelante medidas higiénicas y de seguridad relacionadas con el ambiente de trabajo, con residuos peligrosos provenientes de laboratorios que pueden poner en peligro a las personas o afectar el medio ambiente.

PRECAUCIONES UNIVERSALES

Son medidas para reducir el riesgo de transmisión de enfermedades infectocontagiosas relacionadas con el trabajo del Equipo del Laboratorio. Estas precauciones deben ser agregadas a las Técnicas de Barrera apropiadas para disminuir la probabilidad de exposición a sangre, otros líquidos personales o tejidos que pueden contener microorganismos patógenos transmitidos por la sangre.

PRECAUCIONES ESPECÍFICAS

Están dirigidas a la prevención de ciertas infecciones hospitalarias que son más frecuentes y trascendentes. Las Precauciones Específicas incluyen la aplicación de Técnicas de Aislamiento con el objetivo de proteger a los enfermos en la adquisición de infecciones cruzadas y también de ser personas contagiantes, es decir, transmisores de enfermedades, por ejemplo tuberculosis multirresistentes.

PRECAUCIONES DE TRABAJO

a) Las puertas del laboratorio deben estar cerradas y el acceso al mismo debe estar restringido mientras se lleve a cabo trabajos con materiales biológicos.

b) El laboratorio deberá ser mantenido limpio, ordenado y libre de materiales extraños.

c) No se permitirá comer, beber, fumar o almacenar comida, así como el uso de cualquier otro elemento personal (cosméticos, cigarrillos) dentro del área de trabajo.

d) Usar batas o uniformes dentro del laboratorio. Esta ropa protectora deberá ser quitada inmediatamente antes de abandonar el área de trabajo.

e) Antes de iniciar la tarea diaria asegúrese que la piel de sus manos no presente cortes, raspones u otras lastimaduras. De ser así, cubrir las heridas de manera conveniente antes de trabajar.

f) Usar guantes de buena calidad para todo manejo de materiales biológicos o donde exista, aunque sea de manera potencial, el riesgo a exposición a sangre o fluido corporal.

g) Cambiar los guantes toda vez que hayan sido contaminados. Lavarse las manos y ponerse guantes limpios.

- h) No tocar los ojos, nariz o piel con las manos enguantadas.
- i) Las agujas y otros elementos punzantes deberán ser descartados en un recipiente resistente. Se deben evitar los intentos de reencapuchar, romper o doblar las agujas.
- j) Todos los procedimientos deberán ser realizados de manera tal que sea nula la creación de aerosoles, gotas, salpicaduras, etc.
- k) Las superficies del área de trabajo deberán ser descontaminadas usando para tal efecto una solución descontaminante adecuada.
- l) El recipiente para descontaminar, especialmente deberá contar con tapa de seguridad para todo traslado fuera del lugar de trabajo. En ese caso, el exterior del recipiente deberá ser mantenido libre de toda contaminación con sangre u otros fluidos corporales usando solución descontaminante.
- m) El descarte de los fluidos orgánicos puede efectuarse por las cañerías habituales, una vez que estos hayan sido convenientemente descontaminados.
- n) Una vez usados los guantes, deberán ser colocados dentro del recipiente con solución descontaminante.
- o) Inmediatamente después que el trabajo haya sido terminado lavar las manos con solución iodada (Pervinox jabonoso) y agua, secar las manos con papel absorbente, y si es posible, terminar con unas gotas de alcohol gelificado.
- p) Informar inmediatamente al superior cualquier accidente ocasionado con elementos de laboratorio.
- q) Residuos comunes en bolsa negra. En bolsa roja, todo material contaminado con sangre y/o secreciones.

LIMPIEZA DE APARATOS Y OTROS ELEMENTOS

a) Centrífuga:

Limpiar con solución descontaminante por dentro y por fuera del aparato.

b) Otros aparatos: (microscopios, lectores de ELISA, etc.) Una vez utilizados, deberán descontaminarse las perillas y superficies con solución descontaminante.

LAVADO DE PORTAOBJETOS:

Se considera que todos los portaobjetos se encuentran engrasados aunque se trate de material nuevo.

Lavado de portaobjetos nuevos: no usados y sin aceite

1. Introducir en agua y detergente unos minutos.
2. Frotar entre los dedos uno por uno.
3. Sumergir en agua jabonosa.
4. Enjuagar minuciosamente con agua hasta eliminar el jabón.
5. Sumergir en alcohol de 96° hasta el momento de usar, (o en una mezcla de acetona y alcohol en partes iguales y se deja durante un día).
6. Secar con un trapo uno por uno.

Lavado de portaobjetos aceitados con sangre sin colorear: preparados de reserva

Se deben respetar las normas de bioseguridad sumergiéndolos en dilución para decontaminar durante 15-20 minutos, luego enjuagar con agua fría hasta total eliminación de la sangre.

Luego se lavan como los nuevos pero insistiendo más en la fricción con los dedos.

Lavado de portaobjetos coloreados y con aceite:

1. Dejar por lo menos una hora en agua tibia y detergente. No llevar a ebullición pues el producto ataca la superficie del vidrio despuliéndolo y opacando la lámina.
2. Friccionar vigorosamente entre los dedos.
3. Dejar otra hora en baño de detergente sin agregar polvo limpiador.
4. Proceder como con los portaobjetos nuevos.

ESTERILIZACIÓN Y DESINFECCIÓN

La esterilización es la destrucción de todos los gérmenes, incluidos esporos bacterianos, que pueda contener un material, en tanto que desinfección que también destruye a los gérmenes, puede respetar los esporos.

Se debe recordar que en ciertos casos, los instrumentos son sometidos a la acción de soluciones detergentes o antisépticas para diluir las sustancias orgánicas o evitar que se sequen. Dado que este paso no es una verdadera desinfección, los instrumentos no deberán ser manipulados ni re-utilizados hasta tanto no se efectúe una verdadera esterilización o desinfección suficiente. El HIV es muy lábil y es destruido por los métodos habituales de desinfección y esterilización que se aplican a los instrumentos médicos antes de su utilización.

El calor es el método más eficaz para inactivar el HIV; por lo tanto la esterilización y la desinfección basadas en la acción del calor son los métodos de elección.

La acción descontaminante de los productos que liberan cloro (solución de hipoclorito de sodio (agua lavandina) se aprovecha para tratar los instrumentos inmediatamente después de su uso y permitir, luego, su manipulación sin riesgos hasta llegar a la esterilización o desinfección adecuada.

PROCESO DE DESCONTAMINACIÓN

El proceso de descontaminación, cualquiera sea el agente que se emplee, deberá ajustarse a rigurosas normas de control de calidad. Los descontaminantes más frecuentes y las pautas para su correcta utilización son:

Descontaminantes físicos

- **Vapor:** El autoclavado de los materiales es el método de elección para todo material reusable.
- **Calor seco:** Este sistema es apropiado para elementos y equipos que puedan resistir una temperatura de 180°C, quedando excluidos de este procedimiento algunos materiales plásticos.

- **Ebullición:** Este es el método más simple y confiable para inactivar la mayoría de los patógenos en caso de no disponer de un autoclave. Se consigue un buen nivel de desinfección de instrumentos y equipos cuando estos materiales se sumergen en agua en ebullición durante 20 a 30 minutos.

Descontaminantes químicos

- **Hipoclorito de Sodio, agua lavandina, agua blanqueadora, agua de Javel:** Cuando se diluye en agua, las soluciones de hipoclorito generan ácido hipocloroso, siendo este compuesto el verdadero principio activo de la acción biológica. El ácido hipocloroso reacciona con casi cualquier molécula orgánica, pero en cada reacción individual desaparece una molécula de ácido hipocloroso, es decir, la solución se agota en su principio activo. Esta situación hace necesario adecuar la situación entre agente descontaminante y material descontaminado y establecer conductas para la renovación de las soluciones descontaminantes en el curso del día de trabajo en función de la calidad y cantidad del material a tratar.

LAS SOLUCIONES DE HIPOCLORITO DEBERÁN PREPARARSE EN ESE DÍA. NO DEBERÁN SER USADAS MÁS ALLA DE 24 HORAS DE PREPARADAS.

- **Solución 5 g/L de cloro activo:** Usar para superficies muy contaminadas (material de laboratorio). Dejar en contacto de 30-60 minutos.

PREPARACIÓN: Para 1 L de solución utilizando lavandina de 55 g/L de cloro activo, colocar 90 mL de lavandina en balde limpio más agua corriente hasta completar 1 L de solución.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 30 a 60 minutos (no más).

- **Solución 1 g/L de cloro activo:** Para limpieza de superficies poco contaminadas (paredes, pisos, etc.). Relación volumen de desinfectante volumen de superficie a desinfectar. 1,5 L de lavandina por cada metro cuadrado de superficie.

PREPARACIÓN: Para 1 L de solución colocar 20 mL de lavandina de 55 g/L de cloro activo en balde limpio más agua corriente hasta completar 1 L de solución.

TIEMPO DE EXPOSICIÓN: 10 minutos.

PRECAUCIONES:

- La lavandina concentrada deberá almacenarse a temperatura inferior a 25°C, protegida de la luz en frascos plásticos opacos y bien tapados.
- Nunca utilizar lavandina concentrada como desinfectante o descontaminante ya que es totalmente ineficaz.
- Utilizar las disoluciones especificadas, no aumentar la concentración ya que es inútil por eficacia y costo.
- Periódicamente (todos los meses) deberá determinarse la cantidad de cloro activo de la lavandina concentrada a fin de efectuar las correcciones correspondientes.
- El agua utilizada para la dilución de la lavandina concentrada será agua corriente (no destilada) y fría. Nunca utilizar agua caliente o tibia.
- No superar los tiempos de exposición ya que es inútil.

Otros agentes liberadores de cloro activo

- Cloraminas
- Hipoclorito de calcio

Otros agentes químicos

a) Alcoholes: Tanto el alcohol etílico como el isopropílico son descontaminantes muy efectivos usados en una concentración del 70 %. El primero de ellos es adecuado para superficies tales como mesadas de trabajo o el exterior de los recipientes contenedores de muestras. A su vez el alcohol isopropílico es útil para descontaminar distintos equipos de laboratorio, por ejemplo: microscopios, lectores de ELISA, etc.

Alcohol 70°

Fórmula: Para preparar 1000 mL (1 L) → Alcohol 96° 700 mL + Agua destilada hasta 1000 mL.

PREPARACIÓN: Colocar en un frasco 700 mL de alcohol de 96°, más agua destilada hasta completar 1000 mL de solución.

PRECAUCIONES: El alcohol de 96° no tiene propiedades germicidas, por lo tanto nunca usar alcohol de 96° sin diluir. Necesita de agua para actuar como microbicida.

b) Ioduro de Polividona (PVI): La actividad descontaminante es similar a la del hipoclorito, aunque es claro que no se puede usar en superficies de aluminio o cobre.

c) Formaldehído - formalina: La formalina es un excelente descontaminante, pero su uso está limitada debido a que sus soluciones liberan vapores tóxicos e irritantes.

d) Glutaraldehído: El glutaraldehído es un agente descontaminante de altísima eficacia. Se usa frecuentemente para el tratamiento de materiales y equipos reutilizables y que sean sensibles al calor y al tratamiento de otros agentes químicos.

LAVADO DE MANOS

Definición y objetivos:

Es el método más eficiente para disminuir el traspaso de material infectante de un individuo a otro y cuyo propósito es la reducción continua de la flora residente y desaparición de la flora transitoria de la piel. Se considera que la disminución o muerte de ésta es suficiente para prevenir las infecciones hospitalarias cruzadas.

El lavado de manos elimina la mayor parte de los contaminantes patógenos y la higiene con agua y jabón es suficiente en la mayoría de los casos.

Indicaciones del Lavado de Manos:

- Al ingresar al área de trabajo y al retirarse del mismo (lavado corto).
- Antes y después de tomar contacto con distintos elementos (bolsas colectoras, sueros, ropa de cama, etc.) - (lavado corto).

- Al terminar un turno en el lugar de trabajo (lavado corto).
- Antes y después de ingerir líquidos y alimentos (lavado corto).
- Después de usar los sanitarios (lavado corto).
- Después de estornudar, toser, tocarse la cara, arreglarse el cabello (lavado corto).

Procedimiento

LAVADO CORTO

15 segundos de contacto con el jabón neutro líquido

- 1) Retirar los accesorios de las manos: reloj, anillos, cintas, pulseras.
- 2) Abrir los grifos y regular la temperatura del agua.
- 3) Mojar las manos y muñecas.
- 4) Colocar jabón y friccionar las manos durante 15 segundos (contar hasta 30).
- 5) Enjuagar las manos.
- 6) Secar con toallas descartables desde los dedos.
- 7) Cerrar los grifos con la última toalla del secado.

Importante:

Cuando se termine el jabón líquido, se debe cambiar el recipiente del mismo, nunca se debe rellenar el anterior, debido a que se puede formar en su interior una película de film, la cual atrapa algunas bacterias.

Higiene de Espacios Físicos

Las normas de Higiene Hospitalaria tienen por objeto disminuir la contaminación ambiental y eliminar la suciedad visible.

En los establecimientos Asistenciales hay gérmenes patógenos presentes en los elementos o equipos sucios o contaminados que se pueden comportar como reservorios o fuentes de infección.

GUIA PARA EL MANIPULEO, RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE INTERNO DE MATERIAL CONTAMINADO Y DESECHOS

Definición de Residuos Hospitalarios:

Son aquellos desechos generados en los Centros de Atención de Salud durante la prestación de los Servicios Asistenciales. Pueden ser:

A) COMUNES

B) PELIGROSOS

- a) Asistenciales
- b) Patogénicos (infecciosos-orgánicos)
- c) Especiales

A) COMUNES:

Provenientes de alimentación y limpieza en general. Por ejemplo: Embalajes en general, alimentos en general, cartones, papeles, Áreas de Administración, cocina.

Almacenamiento en bolsa color negro: La no disponibilidad de bolsa color negro obliga a colocar rótulos bien legibles indicando residuos comunes.

Disposición final: En rellenos sanitarios no requieren manejo especial. Igual a la de los residuos domiciliarios. No presenta riesgo de infección ni en el interior, ni en el exterior del Centro Asistencial.

B) PELIGROSOS:

a) Asistenciales:

Provenientes de áreas de internación de enfermos, consultorios externos y salas de emergencias. Por ejemplo: gasas, algodones, guantes descartables, vendas usadas,

sondas, frascos, ampollas, materiales descartables, con sangre u otra materia orgánica.
Materiales descartables de todas las áreas en contacto con pacientes.

Almacenamiento en bolsa color rojo. La no disponibilidad de bolsa roja obliga a colocar rótulos bien legibles indicando residuos asistenciales.

Disposición final: igual que los residuos comunes tipo A en rellenos sanitarios, el riesgo de infección está limitado al interior del Centro Asistencial.

b) Patogénicos:

Todos los elementos punzocortantes y los provenientes de Áreas de Aislamiento, de enfermos infecto-contagiosos, Laboratorio, Microbiología, Sala de Cirugía, de Hemodiálisis, Hemoterapia, Morgue, Necropsias, Anatomía Patológica y Sala de Partos, que tenga presencia de materia orgánica.

Almacenamiento en bolsa color rojo: La no disponibilidad de bolsa color rojo obliga a colocar rótulos bien legibles indicando residuos patogénicos. Representan un riesgo de infección en el interior y en el exterior del Centro Asistencial.

Disposición final: Incineración en hornos pirolíticos, de acuerdo a las normativas legales en vigencia.

Los Residuos Patogénicos, dada la peligrosidad que revisten por el riesgo microbiológico, es necesario procesarlos y eliminarlos de acuerdo a lo establecido por las normas legales en vigencia.

OBJETIVOS:

Realizar un adecuado procesamiento de los residuos hospitalarios para la prevención, disminución y control de las infecciones.

Prevenir la exposición e inoculación accidental del personal con agentes infecciosos.

LEY NACIONAL 24.051 DE RESIDUOS PELIGROSOS

ART.19- A los efectos de la presente Ley, se consideran residuos patológicos los siguientes:

- a) Residuos provenientes de cultivos de laboratorio.
- b) Restos de sangre y de sus derivados.
- c) Residuos orgánicos provenientes de quirófano.
- d) Restos de animales producto de la investigación médica.
- e) Algodones, gasas, vendas usadas, ampollas, jeringas, objetos punzantes o cortantes, materiales descartables, elementos impregnados con sangre u otras sustancias putrescibles que no se esterilizan.

c) Especiales:

Son materiales radiactivos, residuos farmacéuticos o químicos, líquidos inflamables, diluyentes, oncológicos. Por sus características fisicoquímicas requieren un manejo especial por personal capacitado y autorización de acuerdo a las normas establecidas.

EL MANEJO INCORRECTO DE LOS RESIDUOS ES CAUSA PRINCIPAL DE INFECCIONES.

PARA ELLO DEBERÁ CONTROLARSE ESPECIALMENTE:

- a) Que los residuos se separen según su tipo.
- b) Que las bolsas herméticamente se cierren una vez llenas.
- c) Los residuos deben permanecer el menor tiempo posible acumulados en las áreas de trabajo retirándose con una frecuencia de a una vez por turno y siempre que se encuentren llenos los recipientes.
- d) Que los recipientes portabolsas estén siempre tapados.
- e) Que las bolsas sean del color indicado.
- f) Todo el material reusable (tips para micropipetas, tubos para recolección de especímenes, etc. deberá ser ubicado en un recipiente metálico o de plástico, resistente a punciones o cortaduras, conteniendo líquidos descontaminantes y deberá estar ubicado en el mismo lugar de trabajo.

g) Los camisolines, chaquetas u otras prendas protectoras que se usen en el laboratorio, deberán ser colocadas al finalizar la tarea dentro de un recipiente a prueba de pérdidas, el que será transportado de manera segura al lugar adecuado para proceder a la descontaminación y posterior preparación de las prendas para su reuso.

h) Todo elemento descartable (agujas, jeringas, etc.) deberán ser colocados en un recipiente de material resistente a punciones o cortaduras. Será colocado en recipiente a prueba de pérdidas para ser descontaminado e incinerado siempre que esto sea posible.

i) Para la eliminación de todo material contaminado, el método de elección es la incineración de la misma si el incinerador está ubicado en el predio del laboratorio y bajo el control del mismo. En caso contrario este material será autoclavado y luego destruido.

Residuos según su estado:

A. Residuos Líquidos:

- Los residuos líquidos (sangre, heces, vómitos, orina, secreciones, y otros líquidos corporales) pueden desecharse por el inodoro previa descontaminación.
- Esto es posible cuando los efluentes son vertidos a la red sanitaria. Si el establecimiento no cuenta con conexión a la red sanitaria deben ser tratados previamente.
- Usar guantes de goma resistentes para su manipulación. El uso de guantes no invalida el lavado de manos, de acuerdo a la técnica del lavado de manos.

B. Residuos Sólidos:

- Es conveniente que cada Institución determine el circuito de circulación de los residuos y se haga en el horario de menor tránsito de pacientes y personal y que se cumplan con los requisitos exigidos para su manipulación, recolección y transporte teniendo en cuenta la naturaleza de los mismos.

EL TRANSPORTE EXTERNO DE RESIDUOS

Todos los habitantes gozan del derecho a un ambiente sano, equilibrado, apto para el desarrollo humano y para que las actividades productivas satisfagan las necesidades presentes sin comprometer la de generaciones futuras.

Las autoridades de cada establecimiento deberán acordar con los Transportadores de Residuos Peligrosos y Comunes la Transportación y Eliminación de los mismos (Empresas, Municipalidades) a fin de garantizar la seguridad y su correcta disposición final de acuerdo a las Normativas Legales vigentes al respecto.

NORMAS PARA EL CASO DE ACCIDENTES DE TRABAJO:

LAS SITUACIONES DE RIESGO MÁS FRECUENTES EN EL LABORATORIO SON:

- AUTO INOCULACIÓN ACCIDENTAL debido a pinchazos o cortes con agujas, pipetas, bisturís u otros agentes punzantes.
- EXPOSICIÓN DE LA PIEL O MUCOSAS a sangre, hemoderivados u otros fluidos biológicos contaminados, especialmente cuando la permeabilidad de las mismas se encuentra alterada por heridas, excoriaciones, eczemas, lesiones herpéticas, conjuntivitis o quemaduras.
- EXPOSICIÓN A AEROSOLES
- SALPICADURAS EN LOS OJOS

CONDUCTA ANTE ACCIDENTES

TODOS LOS ACCIDENTES CON MATERIAL BIOLÓGICO SERÁN TRATADOS DE LA SIGUIENTE MANERA:

DERRAMES:

- Cuando se produzca derrame de material potencialmente infectado, cubrir el fluido derramado con papel absorbente, volcar alrededor de este material solución descontaminante (hipoclorito de sodio al 10%) y finalmente verter solución descontaminante sobre el papel y dejar actuar durante por lo menos 20 minutos.

- Usando material absorbente, seco y limpio, levantar el material y arrojarlo al recipiente de desecho contaminado para su posterior eliminación.
- La superficie deberá ser enjuagada nuevamente con solución descontaminante, hipoclorito de sodio al 2%.
- Los guantes serán descartados después del procedimiento.
- Lavarse las manos con agua y jabón. Desinfectarlas con alcohol iodado.
- No se recomienda el uso de alcohol ya que este se evapora rápidamente, y además coagula los residuos orgánicos superficiales sin penetrar en ellos.

PINCHAZOS O LASTIMADURAS:

- Los pinchazos, heridas punzantes, lastimaduras con materiales contaminados deberán ser lavados minuciosamente con abundante agua y con solución de jabón cremoso durante 10 minutos; posterior antisepsia con alcohol de 70°.
- Se deberá favorecer el sangrado de la herida sin provocar traumatismos en la zona por demasiada presión.
- Posteriormente realizar cura plana.

SALPICADURAS DE PIEL INTACTA:

- Efectuar arrastre mecánico con abundante agua corriente, no menos de 10 minutos.

SALPICADURAS DE MUCOSAS:

- Ejecutar arrastre mecánico con abundante solución fisiológica estéril, no menos de 10 minutos. Luego agregar colirio simple.
- Permitir el sangrado espontáneo de la herida o punción accidental.
- No utilizar desinfectantes sobre las mucosas (ojo, boca, nariz).
- Cubrir la herida con gasa estéril.

AEROSOLES:

- El sistema de aire y las cabinas de seguridad biológicas serán dejados en ventilación.
- Personal idóneo usando ropas apropiadas podrá entrar al cuarto después de 30 minutos de ocurrido el accidente para efectuar las tareas de descontaminación.

LUEGO SE DEBERA CUMPLIR CON LOS SIGUIENTES RECAUDOS:

- Consultar inmediatamente con el servicio de guardia del establecimiento o lo que corresponda.
- Avisar del accidente al Encargado o Jefe de Sección.
- Dejar asentado en el Libro Foliado de Guardia el accidente a los efectos legales que hubiere, suministrando amplio detalle del mismo y la terapéutica instituida, como así el nombre del responsable que intervino en el procedimiento.
- El médico actuante solicitará al accidentado en forma voluntaria efectuar hepatograma, monitoreo serológico (anticuerpos por ELISA) para la detección de anticuerpos para hepatitis B, C y HIV, en caso de lesión percutánea, contacto cutáneo-mucoso o inyección parenteral de sangre o fluidos corporales provenientes de fuente desconocida como así mismo otro análisis que juzgue conveniente el profesional. La extracción deberá hacerse dentro de las 24 hs. de producido el accidente. Repetir los análisis a los 3 y 6 meses si la primera vez fueron negativos. Drogaprofilaxis según criterio del infectólogo.
- En caso de lesión percutánea, contacto cutáneo-mucoso o inyección parenteral de sangre o fluidos cuya fuente de infección es un paciente HIV positivo conocido o con alto riesgo de serlo, entendiéndose como tales a) los usuarios habituales de drogas de suministro intravenoso b) los politrasfundidos (ej. Hemofílicos) y c) las parejas sexuales de cualquiera de los dos grupos anteriores. Requieren droga-profilaxis.
- Se deben suministrar 2 inhibidores de la transcriptasa reversa más un inhibidor de proteasa por un lapso de 4 a 6 semanas. Se debe comenzar el tratamiento antes de las 2 hs. de producido el accidente, o hasta un máximo de 6 hs. Se admite que hasta 24 o 48 hs. puede atenuarse el curso evolutivo de la infección. En caso de

positivización de la serología en los controles subsiguientes a una exposición de riesgo de fuente desconocida: inicio del tratamiento según criterio del infectólogo.

- Se entiende que todo centro asistencial debe contar con la adecuada disponibilidad de un Kit de emergencia con las drogas a administrar, para poder iniciar el tratamiento en el mismo lugar del accidente.
- Previa explicación se solicitará al paciente cuya muestra originó el accidente el consentimiento por escrito, para efectuarse las determinaciones de hepatitis B, C y HIV y lo que juzgue oportuno el profesional actuante. Se dejará constancia de esto en la Historia Clínica del paciente.
- El accidentado hará la denuncia de su accidente de trabajo de acuerdo a la normativa legal vigente.
- Concurrir a Medicina Laboral.
- Acudir al Servicio de Hepatología o Gastroenterología o Clínica Médica según complejidad del establecimiento, para comenzar a llenar ficha epidemiológica de Accidente Laboral. En ella constarán los datos de identificación, antecedentes personales y se efectuará el seguimiento clínico correspondiente. Debe identificarse, en lo posible, al paciente cuya sangre o secreciones produjo el accidente y valorar sus antecedentes epidemiológicos y conductas de riesgo, dejando constancia en la misma ficha.

CONCLUSIÓN

Toda medida de seguridad laboral (incluyendo aquí las de bioseguridad) contribuyen a la protección de las personas, sean éstas:

- ✓ **Trabajadoras de la salud**
- ✓ **Pacientes**
- ✓ **Población circundante**

El cuidado en el cumplimiento de las medidas indicadas significará la *protección de la vida humana*. Esto es importante aún desde el punto de vista productivo, ya que es sabido que de los dos elementos que componen las fuerzas productivas de un país:

- ✓ **Los medios de producción**
- ✓ **Los hombres que trabajan en ellos**

Estos últimos son los más importantes

REFLEXIÓN

Recordemos que hace 300 años el médico medieval Bernardo Ramazzini escribía este párrafo:

"Deberé confesar que ocasionan no poco daño a los obreros ciertos oficios que desempeñan: Donde esperaban obtener recursos para el propio mantenimiento y sostén familiar, hallan a menudo gravísimas enfermedades y maldicen el arte al que se habían dedicado mientras se alejan del mundo de los vivos..."

Bernardo Ramazzini. De morbis artificum diatriba (1701)

¿Algo ha cambiado en 3 siglos?



**NO PODEMOS ESTAR AJENOS
A LA REALIDAD MUNDIAL Y DE
NUESTRO PAÍS.....**



Tomando en cuenta las recomendaciones surgidas de las reuniones del Comité de Expertos de Influenza el CONSEJO FEDERAL DE SALUD aprueba:

Recomendaciones generales para evitar la transmisión de Influenza A (H1N1)

- El lavado frecuente de manos con agua y jabón
- Cubrir la boca y la nariz al toser y estornudar, y lavarse las manos inmediatamente.
- Limpiar las superficies que tocan los enfermos con agua y detergente o jabón, o alcohol al 70%
- El aislamiento relativo de los pacientes con influenza, para evitar contagiar sobre todo a niños y ancianos convivientes.
- Todo paciente con Influenza no debe salir de la casa, excepto si requiere atención médica.
- Todos los pacientes con Influenza deben colocarse un barbijo y se le debe recomendar que se quede aislado en una habitación y no deambular por la casa.

- Las personas que cuidan a un paciente con Influenza, deben protegerse lavándose las manos y tapándose la boca y la nariz cuando se cuide a un enfermo.
- Ventilar bien la casa cuando sea posible.
- Que el familiar con influenza no salga de la casa, excepto si requiere atención médica.

Con relación a la **definición de caso**, la misma PARA TODO EL PAIS, es:

“Toda persona que presente enfermedad respiratoria aguda febril (>38°C) en un espectro que va de enfermedad tipo influenza a neumonía.”

Definiciones de caso de infección por el virus nuevo de la influenza tipo A (H1N1) (11/05/09 – CDC)

Un ***caso confirmado*** de infección por el virus nuevo de la influenza tipo A (H1N1) se define como una persona con enfermedad respiratoria febril aguda cuya infección por este virus nuevo ha sido confirmada por un laboratorio a través de una o más de las pruebas siguientes:

- **método RT-PCR en tiempo real**
- **cultivo viral**

Un ***caso probable*** de infección por el virus nuevo de la influenza tipo A (H1N1) se define como una persona con síntomas similares a los de la influenza cuyas pruebas resultan positivas para la influenza tipo A, pero negativas para la influenza humana H1 y H3 mediante el método RT-PCR

Opcional:

Un ***caso presunto*** de infección por el virus nuevo de la influenza tipo A (H1N1) se define como una persona que no reúne las características de la definición de caso probable o confirmado, su prueba para detectar el virus nuevo de H1N1 no da negativa y:

- es una persona previamente sana < 65 años de edad hospitalizada por síntomas similares a los de la influenza

ó

- tiene síntomas similares a los de la influenza y vive en un estado sin casos confirmados, pero ha viajado a un estado o un país donde hay uno o más casos probables o confirmados

ó

- tiene síntomas similares a los de la influenza y una conexión epidemiológica en los últimos 7 días a un caso probable o confirmado

Para todos aquellos que se encuentren comprendidos en la definición de caso, se debe recomendar que:

- Debe consultar precozmente a un servicio de salud, donde le indicaran si es necesario un tratamiento antiviral.
- Debe permanecer en aislamiento domiciliario, y no concurrir a su trabajo, lugar de estudio ni realizar actividades sociales.
- Debe utilizar barbijo mientras se encuentra aislado.
- No debe tomar Aspirina.
- No debe automedicarse.

Con relación al uso de barbijos

- El uso de los Barbijos N95 debe estar prioritariamente dirigido al personal de salud que está a cargo de la atención de pacientes con sospecha de infección por el Nuevo Virus de Influenza A (H1N1).
- No es necesario que la población general utilice barbijos.

Con relación a los Estudios virológicos

SÓLO se deberían realizar en:

- Casos de Infección Respiratoria Aguda Grave que requieren hospitalización.
- Casos que ingresen como estudio de laboratorio en las Unidades Centinela

Con relación al Tratamiento

Se debe indicar tratamiento con Oseltamivir a:

- Todo paciente con Infección Respiratoria Aguda Grave (que requiere hospitalización) independientemente del tiempo de evolución de los síntomas.
- Toda persona que sea calificada como caso sospechoso y pertenezca a alguno de los grupos de riesgo para la vacunación contra influenza estacional (según las Normas Nacionales de Vacunación), siempre dentro de las 48 horas de iniciados los síntomas, independientemente de su edad.
- Toda persona mayor de 15 años calificada como caso sospechoso, siempre que se encuentre dentro de las 48 horas de iniciados los síntomas.

Con relación a la Quimioprofilaxis

Se debe indicar quimioprofilaxis a:

- Todas aquellas personas con factores de riesgo, que sean contactos estrechos de casos sospechosos o confirmados.
- *A todos los contactos que no presenten síntomas se les indicará continuar su actividad habitual, y se debe instruir que en caso de presentar síntomas no deben concurrir a su lugar de trabajo o actividad y realizar una consulta precoz.*
- Con relación a la Quimioprofilaxis de personal de salud.
-

La mejor medida de protección para el personal de salud es tomar las medidas de bioseguridad.

El personal de salud que estuvo en contacto con un caso sospechoso o confirmado, o con material biológico de estos pacientes:

- Si tomó medidas de bioseguridad adecuadas, no requiere quimioprofilaxis.
- Si no tomó medidas de bioseguridad adecuadas, y tuvo alta exposición con un caso sospechoso o confirmado, o con material biológico de estos casos, requiere quimioprofilaxis.
- Si no tomó medidas de bioseguridad adecuadas y tiene factores de riesgo, requiere quimioprofilaxis, independientemente del tipo de contacto con un caso sospechoso o confirmado, o con material biológico.

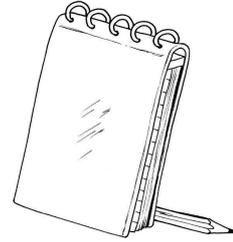
El personal de salud que toma Quimioprofilaxis puede seguir desarrollando sus actividades utilizando barbijo común.



MATERIALES QUE DEBES TRAER A LOS TRABAJOS PRÁCTICOS

Elementos personales:

- Cuaderno y artículos de librería
- Marcador de vidrio Edding 400/404, color negro
- Lazo de goma
- Guantes

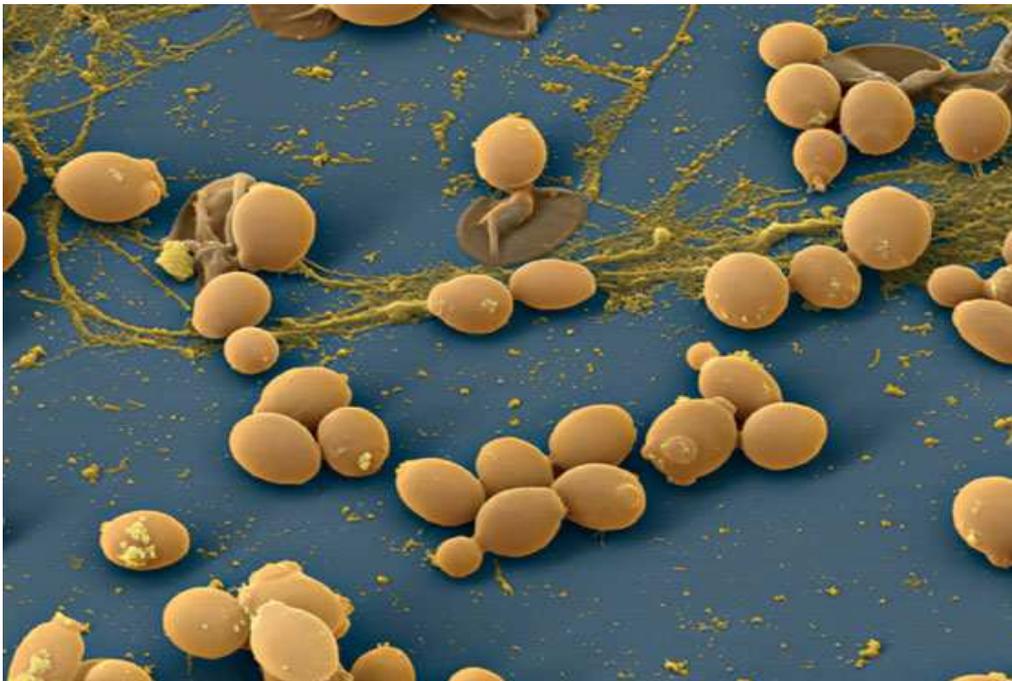


Elementos grupales:

- Detergente no iónico
- Lavandina
- Jabón de tocador líquido
- Rejilla
- Virulana
- Rollo de papel
- Bolsas rojas y negras de basura
- Recipientes para materiales de vidrio y plástico sucios
- Alcohol 70°
- Algodón
- Recipientes de material resistente con tapa para descartar jeringas y agujas



TRABAJO PRÁCTICO N°1
CONCEPTOS GENERALES
CANDIDIASIS E
INMUNOLOGÍA FRENTE A
CÁNDIDA ALBICANS



OBJETIVO

- Comprensión de las bases moleculares de la interacción parásito-hospedador durante las infecciones fúngicas.
- Manejo de la bibliografía científica.
- Capacidad para elaborar y presentar seminarios.

INTRODUCCIÓN

Cándida albicans es un hongo unicelular. Se lo aísla en el 40% en la orofaringe de individuos normales, y en el 70% en el colon. La existencia de *C. albicans* en el tubo digestivo posiblemente esté relacionada con la alimentación, siendo las frutas frescas, dulces y alimentos fermentados los que favorecen su presencia.

En el estado saprófito se encuentra en forma de levadura, célula redondeada u ovalada de 2 a 4 micras, con paredes finas y existe en todas las especies de primates en las que se ha investigado.

En el estado parasitario forma filamentos con extremos redondos de 3 a 5 micras de diámetro, de longitud variable, pues los brotes no lo son.

Las células levaduriformes o blastosporas son microorganismos eucarióticos, las cuales se reproducen asexualmente por un proceso específico de división celular conocido como gemación. Este proceso de división implica la producción de nuevo material celular proveniente de la superficie de la blastospora. Cuando el brote o yema ha crecido y se encuentra en su tamaño óptimo, se suscita la división celular y se forma un tabique o septo entre las dos células.

La forma filamentosa del hongo, denominada hifa, ha sido definida como una estructura microscópica tubular, la cual contiene múltiples unidades celulares divididas por septos y puede surgir a partir de blastosporas o de hifas existentes. Esta crece continuamente por extensión apical.

El desarrollo de la enfermedad por *Cándida* depende de la interacción de ciertos factores:

***Factores predisponentes para la infección:**

FACTORES MECÁNICOS: quemaduras, abrasiones, oclusión local, humedad y maceración, uso de prótesis dentales, vestimentas ajustadas de material sintético, obesidad.

FACTORES NUTRICIONALES: hipovitaminosis (B1- B2 y A), deficiencia de hierro, desnutrición.

ALTERACIONES FISIOLÓGICAS: edades extremas, embarazo, menstruación.

ENFERMEDADES SISTÉMICAS: Síndrome de Down, Acrodermatitis enteropática, Diabetes mellitus, otras endocrinopatías, uremia, cáncer, inmunodeficiencias primarias, SIDA.

IATROGENIAS: catéteres, consumo de drogas e.v., radioterapia, quimioterapia, glucocorticoides, antibióticos de amplio espectro, anticonceptivos, colchicina y fenilbutazona.

***Patogenicidad intrínseca del microorganismo.**

La inoculación experimental de las distintas especies de *Cándida* ha mostrado diferencias en la virulencia entre estos microorganismos, en su capacidad de invadir el estrato córneo y producir inflamación.

Los factores implicados incluyen la adherencia y ulterior invasión a los queratinocitos, mediante la elaboración de enzimas queratolíticas, proteolíticas y fosfolipasas, específicas de cada cepa.

Entre los factores de virulencia cabe destacar las enzimas hidrolíticas aspartil proteinasas segregadas (sap); las isoenzimas Sap 1-3 son cruciales para la infección superficial, las Sap 4-6 serían importantes en la candidiasis invasiva.

***Mecanismos de defensa del huésped:**

A- No inmunes:

- 1- La interacción con otros miembros de la flora microbiana.
- 2- La integridad funcional del estrato córneo.
- 3- El proceso de descamación debido a la proliferación epidérmica inducida por la inflamación.
- 4- Oponización y fagocitosis.
- 5- Otros factores séricos.

B- Inmunes:

- 1- Inmunidad mediada por células.
- 2- Inmunidad humoral.

Para cambiar su comportamiento saprófito a patógeno, *Cándida* tiene que desarrollar algunas características fenotípicas que le permitan penetrar al organismo del hospedero. La propensión de la célula fúngica a cambiar su comportamiento es muy grande y depende de su entorno. Se ha demostrado que el cambio fenotípico en las cepas de *C. albicans* está asociado con las infecciones sistémicas. Para ser considerado como un patógeno, *Cándida* tiene que exhibir dos propiedades fundamentales: la adherencia a los receptores en el hospedero y la producción de enzimas líticas. Está bien establecido que estos dos procesos están asociados con variaciones morfológicas. Operando una transición dimórfica del estado levaduriforme al estado filamentoso, *C. albicans* incrementa sus propiedades adhesivas y la secreción de enzimas

La candidiasis mucocutánea ha sido observada en personas con deficiencias fisiológicas de inmunidad celular. La candidiasis oral en el recién nacido o en la vejez puede estar relacionada con deficiencias del timo. La vulvovaginitis por *Cándida*, asociada con el embarazo o el uso de anticonceptivos, puede estar ligada al papel de la progesterona sobre las células T y sobre la actividad anti-*Cándida* de los leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Además, la gonadotrofina coriónica y la hormona luteinizante inducen la transición de *C. albicans* de la fase levaduriforme a la fase filamentosa. La información clínica sugiere que la respuesta Th1 es sistemáticamente débil durante el embarazo.

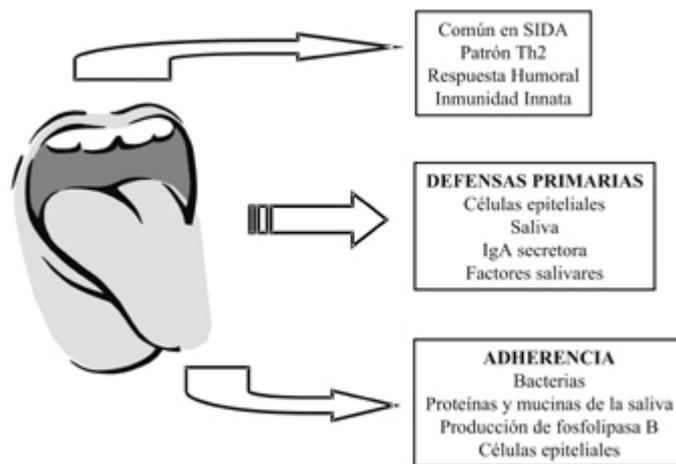
El stress es frecuentemente una causa olvidada de inmunodeficiencia temporal. La regulación neuroendocrina y los efectos cronobiológicos pueden modular notablemente el sistema inmune y proveer la oportunidad de proliferación al hongo. La relevancia del stress en la candidiasis, ha sido examinada sobre la base de que induce deterioro de la respuesta inmune. Datos proporcionados por estudios clínicos que usaron voluntarios sanos, han demostrado el efecto que provoca el stress físico y emocional, aumentando la colonización de las superficies mucosas por *Cándida*.

Además de las modificaciones fisiológicas, hay una larga lista de enfermedades que pueden facilitar el desarrollo de patógenos oportunistas. Deficiencias primarias o secundarias, que afectan las líneas mieloide o linfoide, muestran el papel fundamental de estas células en el control de la autodiscriminación y la homeostasis. La neutropenia y su duración es, obviamente, una de las principales causas de candidiasis sistémica, mientras que la candidiasis mucocutánea está directamente relacionada con

deficiencias de las células T. La diabetes y otras endocrinopatías también son fuentes de candidiasis mucocutánea.

El incremento considerable de las infecciones por *Cándida* en la década pasada, está ligado al desarrollo de nuevas técnicas y drogas, las cuales permiten al clínico penetrar profundamente en la intimidad tisular, celular y molecular de los pacientes, abriendo de este modo puertas para la invasión por *Cándida*. Estos factores, denominados iatrogénicos, involucran nuevas sustancias químicas y técnicas terapéuticas, como son: antibioticoterapia, quimioterapia, corticoterapia, cateterismo trasplante, cirugía.

Candidiasis oral



C. albicans coloniza la mucosa oral entre el 5-50% de los individuos sanos. El uso de corticosteroides predispone a padecer una candidiasis oral y ésta es mucho más frecuente en pacientes que reciben quimioterapia por padecer linfoma y enfermedades hematológicas malignas, los que han recibido un trasplante y los que tienen Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

El papel de la respuesta humoral en la candidiasis oral ha sido estudiado exclusivamente en individuos VIH⁺. Los anticuerpos específicos IgA contra *Cándida* pueden estar normales o elevados en la saliva de los individuos VIH⁺. Estos anticuerpos específicos no parecen proteger a estos individuos de la candidiasis oral.

La resistencia innata de la mucosa oral no ha sido estudiada con respecto a la función celular (por ejemplo, PMN, macrófagos, células asesinas naturales). Las observaciones clínicas, sin embargo, muestran que la candidiasis oral es extremadamente común en individuos neutropénicos. Por otra parte, existen datos en referencia a los efectos de los componentes antimicrobianos asociados a la saliva.

Específicamente con respecto a *Cándida*, se ha demostrado que en la saliva de individuos normales están presentes componentes anti-*Cándida* y que éstos se encuentran reducidos o ausentes en individuos VIH⁺. Adicionalmente, las células epiteliales orales representan un mecanismo de defensa innato para el hospedero. Se desconoce si la actividad anti-*Cándida* de estas células es modulada bajo condiciones de inmunosupresión.

Las defensas primarias a nivel de la mucosa oral incluyen la barrera física epitelial, el péptido antimicrobiano lingual (defensina con efecto antimicrobiano de amplio espectro), IgA secretora, diferentes factores salivares (lisozima, histatinas y lactoferrina entre otros), junto con el propio flujo y arrastre efectuado por la saliva. La alteración más trivial parece ser suficiente para permitir que *C. albicans* produzca una infección localizada y limitada a la mucosa oral, que puede extenderse en casos severos a faringe, esófago e incluso producir una infección diseminada.

Como comensal de la cavidad oral, *C. albicans* puede adherirse a proteínas de la saliva y a bacterias de la cavidad oral para evitar su eliminación de esta zona. Se ha observado aglutinación microscópica y macroscópica de aislados de *C. albicans* con cepas de *Streptococcus sanguis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *S. mitis*, *Fusobacterium nucleatum*, *Actinomyces viscosus*, *Lactobacillus amylovorus* y *Bacteroides gingivalis*.

Candidiasis gastrointestinal

La mucosa gastrointestinal está dotada de un sistema de protección local, en el cual tiene lugar una respuesta inmune con características especiales llamada respuesta inmune asociada a las mucosas. Esta respuesta inmune se desarrolla a partir de tejido linfoide. Se encuentran asociaciones de tejido linfoide no encapsulado por tejido conectivo situado en la lámina propia y las áreas submucosas de los aparatos digestivo, respiratorio y genitourinario. Las células linfoides se hallan presentes, ya sea como cúmulos difusos u organizados en nódulos, solitarios o agrupados, que contienen centros germinales (folículos secundarios). En el ser humano, las amígdalas y las placas de Peyer en el íleon son particularmente prominentes. El epitelio intestinal que cubre dichas placas se halla especializado en el transporte de los antígenos hacia el tejido linfoide. Esta función particular es realizada por unas células epiteliales denominadas células M (micropliegues). Las células M son capaces de absorber y transportar los antígenos para que sean procesados y presentados a las células linfoides subepiteliales por las células presentadoras de antígenos.

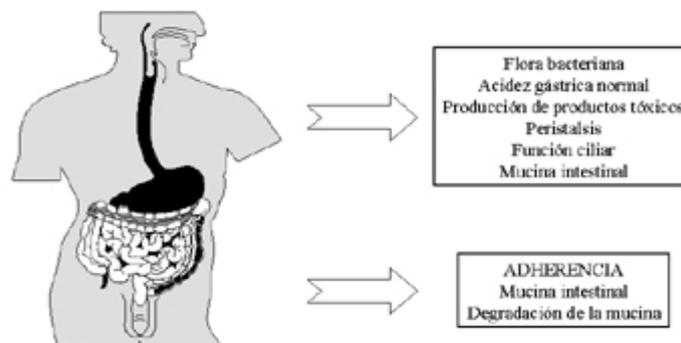
Las respuestas inmunes humorales a nivel de la mucosa son de tipo IgA. La IgA secretora es un anticuerpo que puede atravesar las membranas mucosas y ayuda a impedir la entrada de los microorganismos patógenos. Además de la IgA, se encuentran un gran número de linfocitos en el tejido conjuntivo de la lámina propia y dentro de la capa epitelial de las mucosas. Los linfocitos de la lámina propia son predominantemente células T activadas, aunque también pueden detectarse numerosas células B activas y células plasmáticas. Estas células plasmáticas especiales secretan sobre todo IgA, que se transporta a través de las células epiteliales y se libera en el interior de la luz intestinal. Los linfocitos intraepiteliales son predominantemente células T que exhiben características fenotípicas de las que presentan los linfocitos de la lámina propia. Aunque el fenotipo de los linfocitos de la lámina propia es similar al de los linfocitos de sangre periférica (TCR $\alpha\beta$), un porcentaje elevado de linfocitos intraepiteliales son células TCR $\gamma\delta$, la mayoría de las cuales expresa CD8⁺. La mayoría de los linfocitos intraepiteliales y de la lámina propia son células de memoria.

La función primaria del sistema inmunitario de las mucosas es proporcionar defensa al individuo en la superficie de las mucosas y la función secundaria, pero de igual importancia, es evitar la entrada de antígenos por esta vía y proteger así al sistema inmunitario sistémico de la inadecuada exposición antigénica. Pero estas funciones operan conjuntamente con diversos factores protectores no inmunitarios.

Como el tracto gastrointestinal es frecuentemente colonizado por *Cándida*, su proliferación está controlada por varios factores. Hay evidencia considerable de que la flora bacteriana normal, aeróbica y anaeróbica, inhibe la proliferación de *Cándida* in vitro en el tracto gastrointestinal de modelos animales y en aislados de mucosa intestinal. Los mecanismos que se postulan son competencia nutricional y competencia por el nicho ecológico o por sitios de adherencia. La acidez gástrica normal y la producción de componentes tóxicos como ácidos grasos volátiles y/o ácidos biliares secundarios provocan alteraciones desfavorables en el microambiente para el crecimiento de patógenos. Adicionalmente, el peristaltismo y la función ciliar mantienen el flujo de constituyentes de la mucosa y reduce la interacción de patógenos potenciales con las células epiteliales. La mucina forma una barrera entre estos patógenos y las células epiteliales; además, en ella se encuentran sustancias como la lactoferrina, lactoperoxidasa y lisozima que tienen efectos inhibitorios sobre uno u otro microorganismo específico.

La erradicación de la flora normal por el uso de antimicrobianos de amplio espectro, la administración de glucocorticosteroides y el tratamiento con drogas citotóxicas son factores de riesgo importantes para la infección por *Cándida*. Los mecanismos incluyen inhibición de la inmunidad mediada por células, inducción de hiperglucemia, cambios cualitativos y cuantitativos en la secreción gástrica de mucina y producción de úlceras gástricas. Todo esto se debe a la combinación de cambios locales en la mucosa y al efecto inmunosupresor sistémico.

La mucina intestinal juega un papel importante en la lubricación de la superficie epitelial y en la defensa del hospedero. *C. albicans* se puede unir al residuo C-terminal de 118 kDa de la mucina a través de interacciones hidrofóbicas y la degradación de la mucina es facilitada por la secreción de aspartil-proteinasa 2. Esto implica que *C. albicans* se asocia con la mucina y la degrada; estas dos propiedades pueden modular la población de este hongo en el tracto gastrointestinal. El mecanismo por el cual esto se lleva a cabo es aún desconocido.



Candidiasis vaginal

C. albicans coloniza la mucosa vaginal entre el 5-20% de las mujeres sanas. Se ha estimado que aproximadamente el 75% de todas las mujeres experimentan al menos un episodio de Candidiasis VulvoVaginal (CVV) en su vida (47) y de estas el 20% experimentan un episodio posterior. La Candidiasis VulvoVaginal Recurrente (CVVR) definida como cuatro o más episodios anuales, se presenta en al menos el 5% de las mujeres que han experimentado un episodio de Candidiasis VulvoVaginal Primaria Esporádica (CVVPE)

Históricamente, las infecciones vaginales eran incluidas entre las infecciones de las mucosas afectadas por deficiencias de células T. Los datos basados en estudios experimentales de candidiasis vaginal con un modelo murino estrógeno dependiente,

para evaluar el papel de la inmunidad mediada por células, concluyeron que tanto la inmunidad adquirida como la inmunidad mediada por células o anticuerpos son responsables de proteger al ratón contra la candidiasis vaginal y que la mucosa vaginal tiene cierto nivel de independencia inmunológica. Aunque la CVVR se presenta en ausencia de factores predisponentes conocidos, se ha postulado que es el resultado de alguna deficiencia o disfunción del sistema inmune, pero los resultados de las investigaciones indican que, de existir una deficiencia o disfunción inmune en las pacientes con CVVR, ésta se presenta a nivel local más que a nivel sistémico.

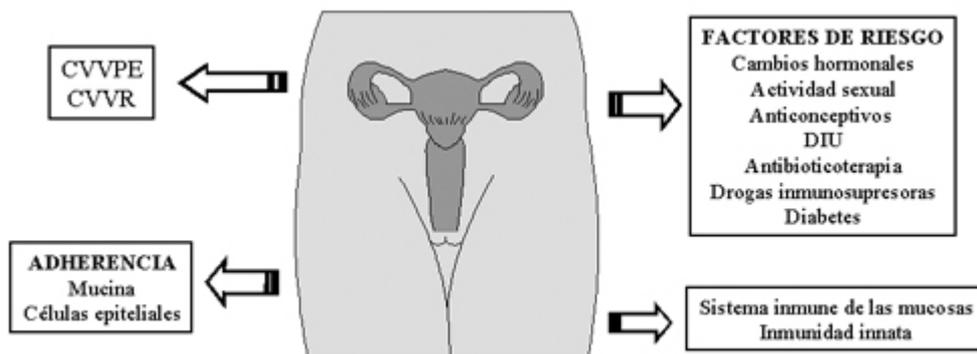
Estudios recientes sugieren que si las células T son importantes, es la respuesta local la que mejor protege contra la infección por *C. albicans*. Esta conclusión está basada en parte en estudios sobre un modelo murino con vaginitis inducida, así como en estudios clínicos en mujeres con CVVR. Aunque las controversias abundan, estudios clínicos controlados apropiadamente sugieren que la vaginitis por *Candida* no es tan común en las mujeres infectadas por el virus de la inmunodeficiencia adquirida y no se correlaciona con el descenso de las células T CD4⁺. Estudios recientes sugieren que la resistencia innata puede ser crítica para la protección contra la infección por *C. albicans*. Aunque los anticuerpos son inducidos frente a la exposición a *C. albicans*, es incierto su papel protector contra las infecciones por este hongo. Varios autores han concluido que los anticuerpos anti-*Candida* no son protectores, pero hay reportes que demuestran lo contrario en la infección experimental por *C. albicans* sistémica o vaginal. La experiencia clínica, sin embargo, demuestra que individuos con deficiencias de inmunidad humoral no tienen un incremento en la susceptibilidad a la infección por este microorganismo.

Aunque la mucosa vaginal carece de áreas linfoides organizadas como las que tiene el tracto gastrointestinal, estudios en animales han demostrado que tiene todos los componentes necesarios para una respuesta inmune competente. Esto incluye expresión de inmunoglobulinas, células T y células presentadoras de antígeno (células de Langerhans, macrófagos) que sirven como células presentadoras de antígenos. Las células T CD4⁺ que predominan en la vagina son CD4⁺ / TCRαβ lo que implica su papel crítico en la respuesta del hospedero contra la infección por *Cándida*. Estas observaciones avalan el concepto de independencia inmunológica o "compartimentalización" de las células T en la mucosa vaginal. En estudios realizados en modelos murinos con vaginitis, no se evidenció la infiltración de linfocitos T sistémicos durante la infección experimental. Estudios posteriores deben evaluar la

expresión local de citoquinas, quimiocinas y de moléculas de adhesión durante la infección para otorgarle mayor importancia a los hallazgos obtenidos hasta el momento.

La inmunidad innata podría jugar un papel significativo contra la vaginitis por *Cándida*, pero muy pocos trabajos avalan esta hipótesis. De hecho, los PMNs no parecen estar involucrados en la protección de la vagina y la mayoría de los estudios han demostrado que las células asesinas naturales no juegan un papel protector en la misma. Adicionalmente, estas células no son residentes de la mucosa vaginal.

Las células epiteliales de la mucosa vaginal producen una variedad de citoquinas y quimiocinas y representan un importante mecanismo de resistencia innata contra *C. albicans*. Se ha demostrado que estas células inhiben el crecimiento de *C. albicans* in vitro. Pero, esta defensa innata probablemente sea muy débil y puede ser opacada fácilmente en presencia de un gran número de microorganismos virulentos. Estudios críticos deben evaluar la actividad anti-*Candida* de las células epiteliales vaginales, de los PMNs, macrófagos y células T en mujeres con CVVR o portadoras de VIH, para poder determinar si las infecciones por *C. albicans* son oportunistas estrictas basados en las deficiencias de la respuesta inmune local, puesto que los hallazgos obtenidos hasta este momento sugieren esa posibilidad.

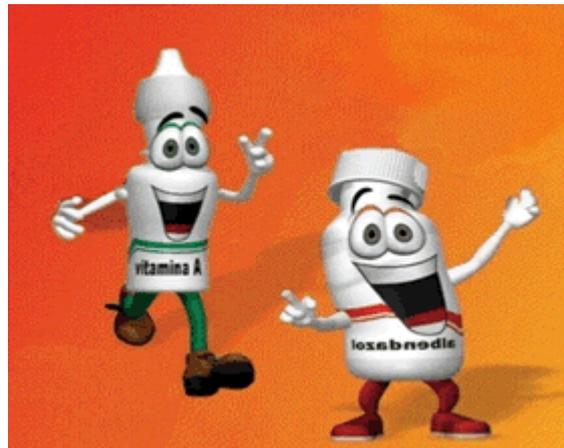


BIBLIOGRAFÍA

- Gozalbo D, Roig P, Villamón E and Gil ML (2004). *Candida* and candidiasis: the cell wall as a potential molecular target for antifungal therapy. *Current Drug Targets-Infectious Disorders* 4: 117-135.
- Gil ML, Delgado ML and Gozalbo D (2001). The *Candida albicans* cell wall associated glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity increases in response to stress and temperature upshift. *Medical Mycology* 39: 387-394.
- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor JE, Fradelizi D and Gil ML (2004). Toll likereceptor-2 is essential in murine defenses against *Candida albicans* infections. *Microbes and Infection* 6: 1-7.
- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, O'Connor, JE, Ferrandiz ML, Fradelizi D and Gil ML (2004). Toll-like receptor-2 is dispensable for acquired host immune resistance to *Candida albicans* in a murine model of disseminated candidiasis. *Microbes and Infection* 6: 542-548.
- Villamón E, Gozalbo D, Roig P, Murciano C, O'Connor JE, Fradelizi D and Gil ML (2004). MyD88 is required for murine resistance to *Candida albicans* and is critically involved in *Candida*-induced production of cytokines. *European Cytokine Network*, 15: 263-271.
- Gil ML, Fradelizi D and Gozalbo D (2005). TLR2, for or against *Candida albicans*. *Trends in Microbiology* 13: 298-299.
- Murciano C, Villamón E, Roig P, Gozalbo D, O'Connor JE, and Gil ML (2006). Toll-Like Receptor 4 defective mice carrying point or null mutations do not show increased susceptibility to *Candida albicans* infections *Medical Mycology* 44: 149-157.

TRABAJO PRÁCTICO N°2

INMUNIZACIÓN



OBJETIVO

Introducir al alumno en metodologías básicas de inmunización de animales de laboratorio, utilizando distintos tipos de inmunógenos y adyuvantes.

INTRODUCCIÓN

La Inmunización es el proceso, natural o artificial, mediante el cual un individuo competente desarrolla una respuesta inmune (humoral, celular o ambas) al entrar en contacto con un inmunógeno.

La síntesis de anticuerpos es dirigida contra moléculas específicas que el organismo no reconoce como propias (epítopes o determinantes antigénicos). Para que esta síntesis ocurra, primero debe existir un contacto entre el linfocito B y el determinante antigénico, contacto que se produce directamente en el caso de los antígenos T independientes (TI-1 y TI-2), pero que debe ser mediado por CPAs y Linfocitos T CD4+ cuando se trata de antígenos T dependientes.

El tipo y magnitud de la respuesta producida se deben a múltiples variables entre ellas se encuentra: la inmunogenicidad de un antígeno, que depende de su complejidad estructural, peso molecular, conformación y naturaleza química, dosis, vía de administración etc.

Con la finalidad de hacer más efectiva la respuesta inmune durante la inmunización se recurre al uso de adyuvantes, sustancias inmunomoduladoras que constituyen una familia muy heterogénea si se toman en consideración su origen, naturaleza química y actividad biológica específica. Algunos adyuvantes son en sí antigénicos (endotoxinas de bacterias gramnegativas, como *Bordetella pertussis*) mientras que otros no lo son (tartrato de aluminico de potasio). El adyuvante incompleto de Freund es una mezcla de aceite mineral con un detergente en diferentes proporciones, mientras que el adyuvante completo de Freund (FCA) contiene además del aceite y el detergente, una micobacteria. En los humanos no se recomienda el uso de este tipo de adyuvantes ya que frecuentemente su aplicación conduce al desarrollo de granulomas severos, restringiéndose su uso en animales de experimentación.

Con el objeto de obtener inmunoglobulinas anti- *Cándida*, se inoculará un conejo por vía subcutánea con una mezcla de FCA y del antígeno producido por nosotros (suspensión de *Cándida albicans*). Concluido el esquema de inmunización, se

tomará una muestra de sangre en la que comprobaremos la presencia de anticuerpos específicos a través de IDR e Inmunofluorescencia.

MATERIALES Y MÉTODO

- Cultivo fresco de *Cándida albicans*
- Adyuvante completo de Freund
- Conejo

Preparación del Antígeno

Se realizará el cultivo de *Cándida albicans* en medio Sabouraud en pico de flauta, cosechándose a las ocho horas, aproximadamente.

Para eliminar todo tipo de residuos, se procede a lavar las *Candidas* con SF centrifugando 10 minutos a 400g. El procedimiento se repite al menos tres veces.

Se resuspende en SF y se ajusta la concentración en cámara de Neubauer a 3×10^6 *Cándidas* /ml.

Para inactivar las levaduras se procede a colocar la suspensión en baño maría a una temperatura de 56°C durante 30 minutos. (Otra opción: formol al 0,7%). Se comprobará la efectividad del proceso resembrando en agar Sabouraud y constando ausencia de desarrollo de colonias visibles.

Inmunización

Inoculación del conejo: se realizará por vía subcutánea, en cuatro puntos distribuidos a los lados de la columna vertebral, con un volumen de 2 ml de una mezcla a partes iguales de FCA y suspensión de *Cándidas*.

La inmunización se llevará a cabo durante las siguientes cuatro semanas de acuerdo al siguiente esquema:

SECUENCIA DE INOCULACIONES	DOSIS DE ANTÍGENO	DE	VÍA DE INOCULACIÓN	SITIO DE INOCULACIÓN
1º semana	2ml de Ag. con FCA		subcutánea	dorso
2º semana	1ml Ag con adyuvante incompleto Freund	de	subcutánea	dorso
3º semana	1ml de Ag con adyuvante incompleto Freund	de	subcutánea	dorso
4º semana	1ml de Ag con adyuvante incompleto Freud	de	Intravenosa	Vena marginal

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

1. Paciente embarazada de la localidad de Charata (provincia del Chaco) que consulta al médico por tener fiebre alta (39°C) desde hace 2 días, dolores musculares y en las articulaciones, y dolores de cabeza de tipo retro-orbital.
 - a. ¿Qué diagnóstico sospecha ante estos síntomas clínicos?
 - b. ¿Qué respuesta inmune desarrollaría la mujer suponiendo que la infección por virus Dengue es producida al haberse expuesto por primera vez frente al serotipo Denv-1?
 - c. ¿Qué respuesta desarrollaría si fuese picada nuevamente por el vector transmisor (*Aedes aegypti*) infectándose con el serotipo Denv-3? ¿Qué manifestaciones clínicas y de laboratorio veríamos en esta infección secundaria?
 - d. Los anticuerpos generados por la madre, ¿afectan al bebé y de qué manera?
2. Indique tipo de muestra, momento de recolección y tipo de análisis o metodología (métodos directos e indirectos) que utilizaría para el diagnóstico de virus Dengue en el laboratorio.
3. De acuerdo a los métodos que nombró en el ítem anterior, diseñe y explique cómo realizaría un método directo y otro indirecto para diagnóstico de Dengue, consignando: tipo de muestra, Ag, Ac, soporte.
4. Conociendo la inmunopatogenia del Dengue, ¿cuáles son los inconvenientes que existen actualmente y que dificultan el desarrollo de una vacuna contra el virus? Imagine cuál podría ser un modelo de vacuna efectiva.

CASO CLÍNICO N°2

Una mujer embarazada de 35 semanas presenta un cuadro gripal. El médico solicita estudio de laboratorio para búsqueda de virus Influenza H1N1.

- a) ¿Que estudios de laboratorio realizaría? Explique brevemente
- b) ¿Considera de utilidad la vacunación? Justifique
- c) Tratamiento

CASO CLÍNICO N°3

Un recién nacido debe recibir las vacunas obligatorias de los 2 meses.

- a) Explique brevemente que vacunas recibe: vía de administración- dosis. Justifique
- b) ¿Qué tipo de antígenos contienen estas vacunas? Ventajas y desventajas.
- c) Si el niño tiene una ID (Inmunodeficiencia) ¿Están contraindicadas?

INVESTIGUE

- 1- Diferencia entre antígeno, inmunógeno y hapteno.
- 2- Antígenos: características, propiedades, tipos.
- 3- Proteínas Recombinantes y péptidos sintéticos. Ventajas y desventajas de su uso.
- 4- Diferentes vías de inmunización. Ventajas y desventajas
- 5- Animales para inmunización. Ventajas y desventajas
- 6- Importancia de la dosis de inmunización.

INFORME

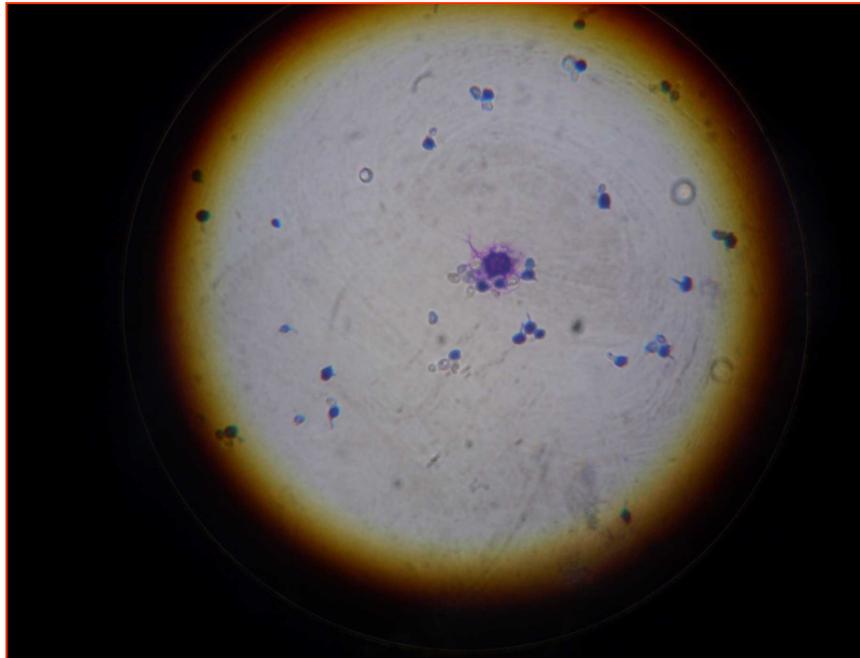
1. Realizar un informe grupal a partir de la investigación individual.
2. Interpretar los casos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Fainboin L, Jeffner J. Introducción a la Inmunología Humana. 5° Edición. 2005. Editorial Médica Panamericana.
- Sanchez de la Baquera Ramos, M. Método Inmunoenzimático para Investigar Antígenos en *Candida albicans*. 1988.
- Mayer, E. Overview of the Immune System. 2004
- Jones, J. Quantitation of Antibody Against Cell Wall Mannan and a Major Cytoplasmic Antigen of *Candida* in Rabbits, Mice and Humans. INFECTION AND IMMUNITY, Oct. 1980.
- Martínez J, Gil M, López-Ribot L y LaJean Chaffin W. Serologic Response to Cell Wall Mannoproteins and Proteins of *Candida albicans*. Clinical Microbiology Reviews, January 1998.
- Eckstein M, Barenholz Y, Bar L y Segal F. Liposomes containing *Candida albicans* ribosomes as a prophylactic vaccine against disseminated candidiasis in mice. Elsevier Science Ltd. 1997.
- Hong Xin, Dziadek S, Bundle D and Cutler J. Synthetic glycopeptide vaccines combining β -mannan and peptide epitopes induce protection against candidiasis. The National Academy of Sciences of the USA 2008.
- Oliver Salvador M, Zárate Segura P, Torres Bustillos L, Balam Muñoz Soto R, Molina Jiménez H, Cortés Arroyo H. Manual de Prácticas de Inmunología Aplicada. 2008.
- Vivotecnia. Protocolo Estándar para la Obtención de Sueros Policlonales de Conejo.

TRABAJO PRÁCTICO N°3

OPSONOFAGOCITOSIS y LISIS DE CÁNDIDA spp por PMNs



OBJETIVO

Evaluar la capacidad fagocítica y lítica de los polimorfonucleares neutrófilos (PMNs) de sangre periférica.

INTRODUCCIÓN

La fagocitosis mediada por PMNs constituye una de las principales defensas del organismo hospedero en su lucha contra las infecciones producidas por bacterias y hongos. El proceso de fagocitosis comprende varios pasos secuenciales: quimiotaxis, adherencia de las partículas antigénicas a la superficie de los fagocitos, captación / ingestión (fagocitosis) y muerte intracelular mediada por mecanismos dependientes e independientes del oxígeno. Los fagocitos poseen receptores para el componente C3b del sistema de complemento, así como para la región constante de la molécula de inmunoglobulina. Esto permite que los microorganismos opsonizados puedan adherirse a la superficie de estas células, facilitando la fagocitosis.

Una actividad fagocítica anormal puede estar asociada con una gran variedad de enfermedades y puede estar ocasionada por un defecto de los neutrófilos, un problema fisiológico asociado con algún tipo de inmunoglobulina, con el sistema de complemento o ambos.

Para evaluar la actividad fagocítica y lítica de los PMNs se utiliza una técnica citomorfológica que consiste en enfrentar a los PMNs, separados por adherencia a portaobjetos, con una suspensión de *Cándida albicans*. Luego de la incubación con las candidas, los preparados se tiñen y se evalúa la fagocitosis y lisis de las levaduras utilizando el microscopio óptico, teniendo en cuenta que las levaduras vivas se tiñen de azul, mientras que las muertas se observan como “fantasmas”.

Se pueden utilizar distintas cepas de levaduras porque son destruidas por los PMNs por mecanismos diferentes: la *C. albicans* por mecanismos microbicidas oxígeno-dependientes, mieloperoxidasa-dependientes, mientras que la *C. pseudotropicalis* (kefyr) es destruida por mecanismos oxígeno-dependientes, mieloperoxidasa-independientes.

C. albicans suele presentarse como una célula oval levaduriforme de 2 a 4 micras, con paredes finas; sin embargo, en tejidos infectados también se han

identificado formas pseudomiceliales (dimorfismo), que son células alargadas de levadura que permanecen unidas entre sí.

Estudios ultraestructurales de la pared celular de *C. albicans* han demostrado una compleja microarquitectura. La pared tiene un espesor variable y está compuesta por varias capas, las cuales se han puesto de manifiesto por diferencias en la densidad electrónica. El número de capas y su morfología varían; esta variación está relacionada con varios factores tales como: la etapa de crecimiento celular, la forma de crecimiento (como levadura o como tubo germinal), la capa seleccionada para su estudio, el medio de cultivo empleado para el crecimiento celular y los procedimientos de fijación.

El **tubo germinal** es una extensión filamentosa de la levadura, sin estrechamiento en su origen, cuyo ancho suele ser la mitad de la célula progenitora y su longitud tres o cuatro veces mayor que la célula madre. *C. albicans* es la única especie capaz de producir verdaderos tubos germinales in vitro, cuando se las enfrenta con suero humano o de conejo fresco a 37°C.

Según la Cándida se presente como levadura o en su forma pseudomicelial, en el foco inflamatorio, los PMNs reconocerán a la cándida, se adherirán a ella y la fagocitarán, a través del reconocimiento de distintos PAMPs por RRP expresados por el fagocito.

MATERIALES Y MÉTODO

- PMNs del paciente en estudio, obtenidos como se detalla a continuación.
- Pool de sueros humanos, fresco e inactivado a 56° C 30’.

Separación de los PMNs

La sangre periférica se obtiene por punción venosa y se colocan aproximadamente 2 ml sobre portaobjetos sellados con silicona. Se incuba a 37° C durante dos horas en cámara húmeda. Se elimina el coágulo lavando el portaobjeto con buffer PBS tibio.

Preparación de la Cándida:

La Cándida se siembra en medio Sabouraud en pico de flauta y se cosecha ocho horas después de sembrada, asegurando una viabilidad del 100%. Las cándidas se lavan con buffer PBS para eliminar residuos, centrifugando diez minutos a 400g. Se

resuspenden en PBS agitando en vortex para obtener microorganismos aislados en una suspensión homogénea y se ajusta a la concentración de 5×10^6 cándidas/ml en PBS con 10% de del pool de sueros (opsonización).

Formación de tubos germinales por *C. albicans*:

1. Preparar una suspensión de *C. albicans* en 0,5 ml de suero humano o de conejo.
2. Incubar a 37 °C durante 2-3 hs.
3. Depositar una gota de la suspensión sobre un portaobjetos limpio y desengrasado, colocar un cubreobjetos y observar al microscopio.
4. Reservar la suspensión para el siguiente procedimiento.

Procedimiento:

Sobre los portaobjetos a los cuales se han adherido los PMNs, colocar 1 ml de la suspensión de cándidas preparadas en distintas condiciones (sin opsonizar y opsonizadas con suero fresco e inactivado, suspensión de cándidas con tubos germinales). Incubar con las células durante 30 minutos a 37° C en cámara húmeda. Al finalizar el periodo de incubación, las levaduras no fagocitadas se eliminan por lavado con PBS tibio (37° C). Los preparados se dejan secar al aire, se colorean con Giemsa diluido (1/10), durante 10-15' y se observan al microscopio. Otra opción, utilizar May Grünwald o metanol para fijar, durante 1' y luego colorear con Giemsa diluido (1/10), durante 10-15'.

La actividad fagocítica se expresa como el número de cándidas ingeridas por 100 PMNs. La actividad lítica se expresa como el porcentaje de cándidas fagocitadas que están muertas (imágenes fantasmas no teñidas por el Giemsa).

Expresión de los resultados:

En sangre periférica de adultos jóvenes y sanos, el rango de actividad fagocítica de PMNS es de 300-400 cándidas fagocitadas /100 PMNs.

En cuanto a la actividad lítica del PMN, ésta es en sujetos normales de 10-15% para la *C. pseudotropicalis* o Kefyr y de 12-17% para la *C. albicans*.

Interpretación de resultados:

Valores disminuidos de actividad fagocítica indican un defecto severo en la función de los PMN, generalmente asociado a una inmunodeficiencia primaria o secundaria.

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

Paciente de seis años y 2 meses, sexo masculino, que consultó al hospital por cuadro de 10 días de evolución de fiebre, tumoración occípito-biparietal y submamaria, con antecedente de haber presentado dos meses antes, un absceso en región mamaria izquierda que requirió drenaje quirúrgico. Al examen físico se evidenció desnutrición grave, fiebre, taquipnea, tumoración en la región occípito-biparietal, una lesión supurativa en la región submamaria izquierda, disminución del murmullo vesicular en hemitórax izquierdo y sudoración profusa. En sangre periférica se observó leucocitosis con neutrofilia y desviación a la izquierda con signos de infección (granulaciones tóxicas). La VSG estaba acelerada y el proteinograma electroforético evidenciaba una hipergammaglobulinemia. En el material obtenido por punción aspiración de abscesos de cuero cabelludo se observó la presencia de filamentos tabicados en el examen directo y *A. fumigatus* en el cultivo. Igual recuperación microbiológica se obtuvo de la biopsia de aponeurosis y músculo de pared del hemotórax izquierdo y de lavados gástricos. La prueba de ID en gel de agarosa mostró tres bandas de precipitación con antígeno de *A. fumigatus*. La prueba de NBT mostró ausencia en la capacidad oxidativa de los fagocitos.

- a. Teniendo en cuenta los datos clínicos y de laboratorio, ¿Qué diagnóstico sospecharía?
- b. Indique el/los posible/s genotipo/s y fenotipo (manifestaciones clínicas e inmunológicas desencadenadas) que caracterizan a esta enfermedad.
- c. Haga un listado de los estudios de laboratorio que considera serían convenientes para llegar al diagnóstico.
- d. ¿Qué opciones de tratamiento existen actualmente para afrontar esta patología?

CASO CLÍNICO N° 2

Observe detenidamente las siguientes imágenes que corresponden a un caso clínico y responda:



Figura 1. Se aprecia coloración plateada del pelo en lactante femenino de tres meses.

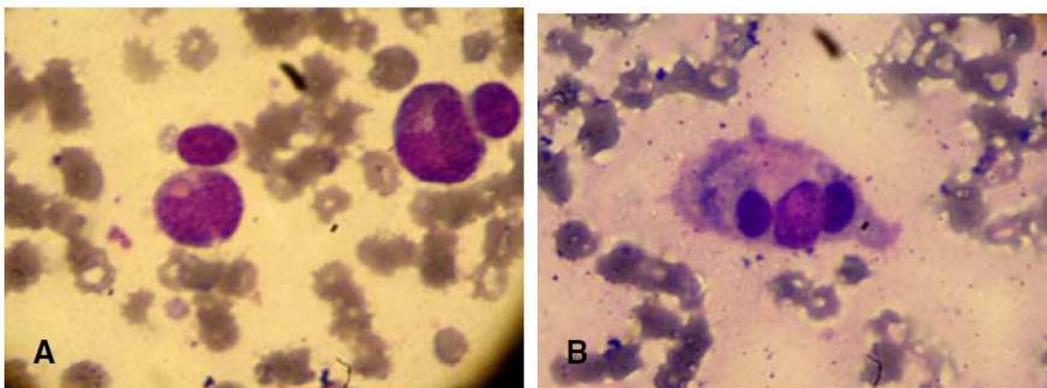


Figura 2. Con microscopio de luz en médula ósea se observan:
a) Inclusiones lisosomales en granulocitos. 100 x 10 (Inmersión).
b) Se observa hemofagocitosis intensa, en acercamiento fagocitosis de linfocitos. 100 x 10 (Inmersión).



Figura 3. En frotis de sangre periférica se observan neutrófilos con gránulos gigantes 100 x 10 (Inmersión).

- a. ¿Qué patología presenta la paciente?
- b. Mencione características fenotípicas más frecuentes.
- c. Indique tipo de inmunidad comprometida y si se trata de una alteración de tipo funcional y/o cuantitativa.

3.

CASO CLÍNICO N° 3

Mujer de 18 años de edad, recientemente diagnosticada de DM, y en estudio por una tumoración submandibular, que acude al Servicio de Urgencias de un hospital por presentar dolor en extremidades inferiores de 15 días de evolución, así como sensación febril no termometrada. A la exploración física presenta T de 37,5 °C y astenia. A nivel de muslos se observaban varias lesiones maculares, ligeramente dolorosas a la palpación, los muslos se encontraban tumefactos y empastados, desencadenándose importante dolor a la palpación, así como a la movilización, tanto activa como pasiva, de las extremidades inferiores. La bioquímica de sangre reveló una leucocitosis de 16.000/mm³ con desviación izquierda, enzimas musculares y resto de analítica fue normal. En el muslo izquierdo estaban afectados los abductores con presencia de abscesos. Las colecciones fueron drenadas quirúrgicamente, realizándose baciloscopia y cultivo del exudado. En el cultivo de varias muestras fue aislada *Cándida albicans*. Se comenzó tratamiento por vía parenteral con fluconazol asociado a VAN e IMP durante seis semanas. La paciente mejoró clínicamente con resolución casi por completo de las lesiones musculares. A los 20 días del alta hospitalaria ingresa por presentar nuevamente dolor en ambos muslos y supuración por drenaje espontáneo de un absceso, cultivándose nuevamente *Cándida albicans*.

Ante la presentación de este complejo y recidivante cuadro clínico, se investigó la posibilidad de estar asociado a alteraciones de la función de los neutrófilos, demostrándose un déficit de MPO.

Investigue:

- a. Mecanismo inmunopatológico subyacente.
- b. ¿De qué manera compromete la inmunidad de la paciente, la coexistencia de DM y deficiencia de MPO?
¿Qué ocurriría si la paciente se infectara con *C. pseudotropicalis*.

CASO CLÍNICO N° 4

Niño de 2 años de edad que ingresa al Servicio de Emergencia por lesión en mano izquierda. Refiere infección respiratoria con broncoobstrucción y fiebre de 5 días de evolución, por lo que se le indicó tratamiento con amoxicilina, salbutamol y dipirona. A las 48hs presentó lesión periungueal en el primer dedo de la mano derecha con edema y rubor, y progresión necrótica, motivo de la consulta.

Datos del laboratorio: Hemograma: glóbulos blancos 2.100 elementos/mm³, Neutrófilos 33 elementos/mm³, linfocitos 1.948 elementos/mm³, hemoglobina 13,2 g/dl, plaquetas 322.000.PCR: 155 mg/l. Se recibe cultivo de exudado de lesión de mano y hemocultivo que informa *Staphylococcus aureus* meticilino sensible. Con el diagnóstico de neutropenia severa de etiología aún no determinada, se aísla el paciente y se inicia factor estimulante de colonias granulocíticas (rhG-CSF-filgrastim). Continúa con cefradina, gentamicina y dipirona por vía intravenosa. A las 48 horas de filgrastim persiste con picos febriles de 39°C y mantiene la neutropenia severa, por lo que se suspende la dipirona. A los 18 días de hospitalización (15 días de filgrastim, 13 días de suspensión de la dipirona y cuarto día de hidrocortisona), el niño presenta mejoría del estado general, se mantiene en apirexia, sin edema ni rubor en la mano y se observan mejorías en el hemograma.

Defina:

- Serie granulocítica en RN- niño de 2 años- adolescente- adulto- anciano.
- Agranulocitosis primaria y adquirida. Causas.
- Neutropenia leve, moderada y severa. Relacione con severidad de la infección.

CASO CLÍNICO N° 5

Lactante de 5 meses con antecedentes de onfalitis y celulitis periumbilical que se inicia a los 15 días de vida con eritema, aumento del volumen del área periumbilical y demora en la caída del cordón umbilical (que ocurrió a los 21 días de vida). Al examen físico se observa abdomen con hiperemia y periumbilical, y un área nodular y fluctuante. La palpación es dolorosa pero con escasa secreción purulenta: de un material blanco amarillento y fétido. El hemograma proporciona los siguientes datos: leucocitosis de 80,000/mm³ y neutrófilos en bandas de 9%; neutrófilos con granulaciones tóxicas, sin más anormalidades morfológicas en el frotis de sangre periférica. Los hemocultivos fueron negativos y el cultivo de la secreción umbilical positivo a *Pseudomonas aeruginosa*. A su ingreso el manejo antimicrobiano se hizo con cefalotina, amikacina y después con ceftazidima. La aspiración de médula ósea reportó: celularidad aumentada con la serie eritroide disminuida, serie megacariocítica normal y granulocítica aumentada, en distintas etapas de maduración. La citometría de flujo, con anticuerpos monoclonales anti CD11b/CD18, mostró ausencia de integrinas B2 en toda la población leucocitaria.

Defina

- Onfalitis.
- ¿Cuándo cae el cordón umbilical normalmente? ¿Porque puede demorar su caída?
- ¿Qué significa presencia de pus, cuál es la causa, por qué puede no haber?
- ¿Es significativo pensar en neutrofilia y ausencia de pus? ¿Qué indica?
- Diagnóstico. Tratamiento

CASO CLÍNICO N° 6

Lactante de 7 meses que concurre al hospital por fiebre de 39°C, tos húmeda, disnea progresiva, vómitos y diarrea de 4 días de evolución. Refiere a los 2 meses gastroenteritis con paro cardiorespiratorio que amerita ventilación mecánica asistida durante 7 días. Como consecuencia infección respiratoria por Pseudomonas aeruginosa por lo que recibió antibioticoterapia por 30 días. A los 4 meses fue hospitalizado por Neumonía apical derecha por Staphylococcus aureus. Se realizan los siguientes estudios: Prueba nitroazul de tetrazolio (NBT): positivo, Mieloperoxidasa normal, serología para hongos negativo, inmunoglobulinas normales; neutropenia severa con valor absoluto de neutrófilos (VAN) 91/mm³, eosinofilia 1094/mm³, monocitosis 1727/mm³, trombocitosis 689 000/mm³ y anemia (Hemoglobina: 9,9 g/dL, Hematocrito: 29 %, Volumen corpuscular medio: 78 fL. Concentración hemoglobina corpuscular media: 28 g/dL, Velocidad de sedimentación globular: en la 1ª Hora 93 mm, Proteína C reactiva: 8,7 mg/dL. Ferritina: 828 ug/dL. Folato: 6,83 ng/dL. Vitamina B12: 348 ng/dL. Sub poblaciones linfocitarias (CD4 y CD8 normales), complemento (C3-C4 normales), VIH negativo, PPD negativo, VDRL negativo. Se realiza aspirado y biopsia de médula ósea que reporta: normocelular con ausencia de maduración neutrofilica, incremento de eosinófilos y depósitos férricos incrementados.

Determine:

- Diagnóstico y Tratamiento

INFORME

1. Analizar a partir de los ensayos realizados, las variaciones de la función fagocítica del PMN en presencia de Cándidas sin opsonizar y opsonizadas, así como tubos germinales.
2. Interpretar los casos clínicos presentados, adjuntando la bibliografía consultada en cada caso.

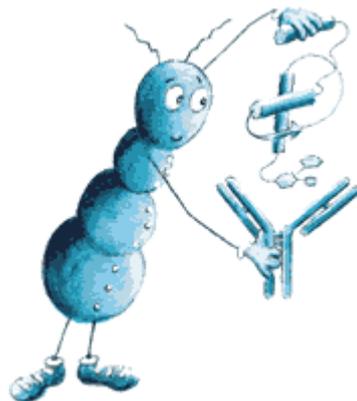
BIBLIOGRAFÍA

- Estevez ME, Sen L. Capacidad funcional de los monocitos humanos normales: una simple técnica para su exploración. *Sangre* 1978. 23(6):870-875.
- Eyles JL. Granulocyte colony stimulating factor and neutrophils – forgotten mediators of inflammatory disease. *Nat Chem Pract Rheumatol*. 2006: 500-510.
- Hampton M, Winterbourn C. Methods for quantifying phagocytosis and bacterial killing by human neutrophils. *Journal of Immunological Methods* 232_1999.15–22.
- Jutras I, Desjardins M. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2005; 21:511-27.
- Klebanoff SJ. Myeloperoxidase: friend and foe. *J Leukoc Biol*. 2005 May; 77(5):598-625. Epub 2005 Feb 2.
- Lehrer R. Functional Aspects of a Second Mechanism of Candidacidal Activity by Human Neutrophils. *The Journal of Clinical Investigation* 1972. Volume 51 .
- Manual de Técnicas. Instituto de Investigaciones Hematológicas “Mariano R Castex”. Academia Nacional de Medicina de Buenos Aires. Editores Luis J Bergna y María A Lazzari, 1991.
- Molina Castro R, Álvarez García A, Pérez Toledo L, Sánchez Valdez L, Torranzo Soto Y, Luzardo Suárez C. Evaluación de la función opsonofagocítica de los neutrófilos en pacientes infectados por el VIH. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter* 2002; 18(1):48-54.
- Nauseef WM. How human neutrophils kill and degrade microbes: an integrated view. *Immunological Review* 2007. Vol 219: 88- 102.
- Pardi G, Cardozo Elba I. Algunas consideraciones sobre *Cándida albicans* como agente etiológico de candidiasis bucal- *Acta Odontológica Venezuela*.2002.
- Petrova A, Mehta R. Dysfunction of innate immunity and associated pathology in neonates. *Indian J Pediatr*. 2007 Feb; 74(2):185-91.
- Rojas-Espinoza O, Arce Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Segunda Parte. *Bioquímica* 2003 18- 28.
- Rojas-Espinoza O, Arce Paredes P. Fagocitosis: mecanismos y consecuencias. Tercera Parte. *Bioquímica* 2004 55- 67.

- Sin Mayor A, Castellanos Puerto E, Rodriguez Acosta M, Vázquez González T, Jonhston Dreke N, Rojas Moys A. Alteraciones del mecanismo de la fagocitosis en el paciente politraumatizado. Rev Cubana Med Milit 2000. 29(2):109-113.
- Stuart LM, et al. Phagocytosis: elegant complexity. Immunity. 2005 May; 22(5):539-50.
- Torres Leyva I, Pérez L, Marsán Suárez V, Socarrás Ferrer BB, Macías Abraham C. Evaluación evolutiva de la función fagocítica de los polimorfonucleares. Revista Cubana Hematología 2004. 20(2):106-110.

TRABAJO PRÁCTICO N° 4

SEPARACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE SUERO HUMANO



OBJETIVO

Aislar Inmunoglobulinas de suero humano.

INTRODUCCIÓN

La solubilidad de las proteínas depende de la interacción de las moléculas de proteínas entre sí, y entre ella y el solvente que por lo general es agua. El agua de imbibición se fija por el carácter bipolar del agua y la cantidad fijada depende, por consiguiente, de las cargas eléctricas de las proteínas. Si se agregan sales, como el sulfato de amonio en ciertas concentraciones, las proteínas en solución acuosa, pueden ser precipitadas. La explicación de este fenómeno parece residir en que la sal neutraliza las cargas eléctricas, por tener iones de carga opuesta, produciéndose la deshidratación de las proteínas, ya que estas sales tienen también tendencia a fijar agua.

Las inmunoglobulinas, como toda proteína, pueden ser separadas de otras proteínas plasmáticas por diferencias de solubilidad en un determinado solvente. Así, éstas pueden ser precipitadas causando una perturbación en el solvente al modificar su pH, fuerza iónica o temperatura.

En general, las inmunoglobulinas son insolubles en agua o en soluciones de baja concentración salina), no así la albúmina que sólo precipita a muy altas concentraciones de sales. Por ello un primer paso que permite separar fácilmente a las inmunoglobulinas de su principal contaminante en plasma, la albúmina, es una precipitación con sulfato de amonio. Este método permite enriquecer la muestra proteica en inmunoglobulinas.

Al agregarse con cuidado sulfato amónico al plasma o suero sanguíneo, la primera proteína precipitada corresponde al fibrinógeno. Si se sigue añadiendo la sal hasta alcanzar una semi saturación, precipitan las globulinas: si se llega a la saturación (4,2 moles x litro) precipita la albúmina. Esta separación puede hacerse en forma paulatina y de esa manera se consiguen fracciones que corresponden a las que se obtienen por medio de la electroforesis.

Si bien el trabajo práctico consiste en utilizar la precipitación salina como un método de separación de las inmunoglobulinas, basado en las características fisicoquímicas, es importante destacar, que en una etapa posterior se podría purificar la

IgG de las inmunoglobulinas totales por una cromatografía de exclusión molecular o cromatografía de intercambio iónico, basándose en los diferentes tamaños moleculares de las inmunoglobulinas o en las diferencias en sus puntos isoeléctricos.

MATERIALES Y MÉTODO

- Tubos de ensayo de vidrio, pipetas, goteros plásticos
- Suero humano
- Solución fisiológica
- Solución saturada de sulfato de amonio: disolver 80 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ en 100 ml de agua destilada hirviendo
- Dilución 1:2 de solución saturada de sulfato de amonio
- Tira indicadora de pH
- Buffer PBS (solución salina tamponada de fosfatos)
- Bolsitas para diálisis
- Buffer de electroforesis con indicador de corrida, pH: 8,6
- Tiras de cellogel (acetato de celulosa)
- Colorante Ponceau S.
- Solución decolorante: ácido acético al 5%
- Solución transparentizadora: ácido acético puro y metanol (1:9)
- Vortex
- Centrífuga
- Estufa de secado
- Cuba de electroforesis y fuente de poder

PROCEDIMIENTO

a) Precipitación de inmunoglobulinas

1. En un tubo de vidrio colocar 5 ml del suero a purificar,
2. agregar lentamente sulfato de amonio saturado hasta completar 5 ml, efectuando la mezcla sobre vortex,
3. medir pH y ajustar a 7.8,
4. dejar en reposo y en heladera 10',

5. centrifugar a 4000 rpm durante 10',
6. eliminar el sobrenadante midiendo su volumen y agregar al precipitado igual volumen de la solución 1:2 de sulfato de amonio saturada,
7. este paso se repite hasta que el precipitado a descartar sea límpido,
8. reconstituir el precipitado en 5 ml de PBS o agua destilada.

b) Desionización

En vaso de ½ litro realizar desionización en bolsita de diálisis contra solución fisiológica. Cambiar a las 2 hs. Dejar reposar toda la noche a temperatura ambiente.

c) Control por electroforesis en Acetato de Celulosa

1. En una tira de acetato de celulosa para electroforesis correr suero humano control, junto a las inmunoglobulinas obtenidas,
2. utilizar la técnica semimicro para el sembrado (concentrar repitiendo la siembra como mínimo 5 veces),
3. tiempo de corrida: 45' aprox. en buffer de electroforesis, pH: 8.6,
4. intensidad de corriente: 2,5 mA por tira,
5. transparentizar.

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N°1:

Embarazada de 20 semanas de gestación 0 Rh (-), con amenaza de aborto. El médico le indica la administración de anti-D.

- 1- Importancia de embarazos previos y del grupo sanguíneo del esposo y de hijos anteriores.
- 2- ¿Cómo se obtienen estos anticuerpos?
- 3- ¿En qué otras situaciones estaría indicado el suministro de Ig anti-D?

CASO CLÍNICO N° 2

Hombre de 30 años que refiere haber sido mordido en la parte superior de la mano derecha por *Bothrops alternatus* conocida como “yará grande”. Inmediatamente recibió asistencia no profesional y fue remitido al Centro de Salud más próximo, llegando después de 10 hs. Al examen físico se constata importante edema, rubor y calor en el dorso de la mano que comienza a extenderse al antebrazo predominando siempre los signos inflamatorios, acompañado de fiebre que comienza a ser constante y rebelde a los antitérmicos. Se observa aparición de algunas ampollas y flictemas con líquido claro y transparente en su interior. De urgencia administran suero antiofídico por vía intravenosa.

- 1- Comente acerca del cuadro fisiopatológico de una mordedura por serpiente.
- 2- Describa los datos de laboratorio que espera obtener
- 3- Con respecto al suero antiofídico ¿Cómo se obtiene?
- 4- ¿Considera importante purificar Ig? ¿Por qué?
- 5- Comente acerca de nuevos avances en la obtención de antisueros.
- 6- ¿Qué estrategia emplearía para disminuir la frecuencia de reacciones de hipersensibilidad?

CASO CLÍNICO N°3:

Niño de 4 años con infecciones recurrentes de oído, sinusitis, bronquitis y neumonía por bacterias extracelulares. El médico sospecha Inmunodeficiencia por anticuerpos.

- 1- ¿Cómo podría en el laboratorio determinar ID por anticuerpos?

2- De acuerdo a los datos de laboratorio, ¿de qué tipo de ID por anticuerpos se trata?

IgA: 0 mg/dl (52-256)

IgG: 1 733 mg/dl (VN 774 a 1 641)

IgM: 129 mg/dl (VN 36 a 240}.

Un año después, las concentraciones sericas de IgG e IgM seguían dentro de los márgenes normales y la IgA no era detectable por la misma técnica. La concentración de IgA secretora en la saliva era también 0 mg/dl, mientras la de IgE era 63,8 UI (VN: 0 a 90 UI).

3- ¿Es importante tener en cuenta la edad? Justifique.

4- ¿Recomendaría la administración de gammaglobulina endovenosa como tratamiento para este paciente? ¿En qué otras patologías se podría recomendar su aplicación?

5-¿Cómo se obtendría gammaglobulina para uso endovenoso?

CASO CLÍNICO N° 4

Paciente de 78 años que ingresa con mialgias, fiebre, compromiso del estado general, baja de peso de 4 kg, alteraciones del sensorio, con desorientación temporo-espacial, tos y expectoración mucosa de 2 semanas de evolución por lo que recibió tratamiento con cefuroxime y azitromicina, sin observarse respuesta. En su historia clínica consta resección transuretral de próstata por adenoma prostático e infiltración linfocítica a nivel de microvasculatura. *Laboratorio:* Hematocrito 34,9%, leucocitos 9.600/ℓ, neutrófilos 5.088/ℓ, linfocitos 2.496/ℓ, monocitos 2.016/ℓ, plaquetas 215.000/ℓ, VHS 107 mm/h, proteína C reactiva 10,95 (valor normal <1 U/dL), láctico deshidrogenasa (LDH) 861 U/L (valor normal <618 U/L), Antígeno prostático específico 1,89 (valor normal <4 ng/ml), Se revisó la biopsia de próstata tomada 8 meses antes y se observó un infiltrado intravascular linfoide, CD45 (+), CD20 (+) estableciéndose el diagnóstico de linfoma intravascular de células grandes. El paciente inició quimioterapia CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina y prednisona) sin mejoras y con evidencia de actividad tumoral: fiebre, aumento de VHS, aumento de LDH y alteración de su estado de conciencia, se administró rituximab (anticuerpos monoclonales anti CD20. Mabthera Roche) 375 mg/m² semanal por cuatro dosis. El paciente entró en remisión clínica de sus síntomas, normalización de LDH,

normalización de su estado mental y desaparición de la tos, manteniéndose en remisión clínica completa con 24 meses de seguimiento.

Describe:

- a. ¿Qué es el rituximab?
- b. ¿Cómo se obtienen y purifican los anticuerpos monoclonales?
- c. ¿Cómo se obtiene un anticuerpo quimérico y un anticuerpo humanizado?

CASO CLÍNICO N°5

Paciente femenina de 11 años de edad que fue mordida en pie derecho y mano izquierda por un cachorro con rabia confirmada. A los 8 días del incidente se inició esquema de vacunación antirrábica (vacuna extraída de cerebro de ratón lactante). Treinta y nueve días después, habiendo recibido 8 dosis de vacuna, acudió al servicio de emergencias por presentar un cuadro de 5 días de evolución caracterizado por cefalea, debilidad y parestesias, estas últimas se iniciaron en antebrazo y ascendieron progresivamente hasta la región cervical. Se decide su internación. En el segundo día de internación presentó sialorrea espesa, taquicardia, taquipnea, hiporreflexia y rigidez de cuello, además convulsiones tónico-clónicas generalizadas. Se realiza punción lumbar: líquido cefalorraquídeo cristal de roca con 21 células por campo a predominio polimorfonuclear, proteinorraquia normal y glucorraquia de 63 mg/dL. Falleció 7 días después de su internación por falla cardíaca. Se realizó biopsia cerebral (hipocampo) para inmunofluorescencia que fue positiva para rabia, confirmándose el diagnóstico.

Describe:

- Considera correcto la utilización de la vacuna. Justifique.
- Métodos diagnósticos y tratamientos posibles.
- ¿Cómo se obtiene el suero antirrábico?
- Sería a su criterio de utilidad obtenerlo en gallinas. Justifique.

CASO CLÍNICO N 6

Las infecciones por Rotavirus son la causa más común de diarrea en niños menores de 5 años ocasionando un gran número de muertes al año. Un diagnóstico rápido

permitiría instaurar un tratamiento adecuado y evitar el uso innecesario de antibióticos, como implantar medidas preventivas que eviten su transmisión en la comunidad y en el nosocomio.

Con este objeto queremos desarrollar un método que permita la detección precoz de antígenos de la cápside viral en heces utilizando un anticuerpo específico obtenido en el laboratorio.

Determine:

- ¿Cómo podría obtener el anticuerpo específico? Monoclonal o policlonal? Justifique.
- ¿Es importante purificar? Justifique.
- ¿Realizaría fraccionamiento enzimático? Justifique.

INFORME

- A partir de la corrida electroforética, interpretar el resultado obtenido.
- Interpretar los casos clínicos presentados, adjuntando la bibliografía consultada en cada caso.

BIBLIOGRAFÍA

- Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5º Edición. Editorial Médica Panamericana. 1996. ISBN 8479033177.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5º Edición. Español. Editorial Harcourt. 2000. ISBN 8481744972.
- Roitt IM, Delves P . Inmunología. Fundamentos. 10º Edición. Editorial Médica Panamericana. 2003. ISBN 950061869-9 8479038144.
- Rose, Conway de Macario, Fahey, Friedman and Penn. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. 1992. American Society for Microbiology.
- Stites DP. Inmunología Básica y Clínica. 10º Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003. ISBN 9684269978.
- Thömmes J, Etzel M. Alternatives to chromatographic separations. Biotechnol Prog. 2007; 23(1):42-5.
- Roque AC, Silva CS, Taipa MA. Affinity-based methodologies and ligands for antibody purification: advances and perspectives. J Chromatogr A. 2007; 1160(1-2):44-55. Epub 2007 Jun 21.
- Flatman S, Alam I, Gerard J, Mussa N. Steve. Process analytics for purification of monoclonal antibodies. J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci. 2007; 848(1): 79-87.
- Horenstein AL, Durelli I, Malavasi F. Purification of clinical-grade monoclonal antibodies by chromatographic methods. Methods Mol Biol. 2005; 308: 191-208.
- Muronetz VI, Sholukh M, Korpela T. Use of protein-protein interactions in affinity chromatography. J Biochem Biophys Methods. 2001; 49(1-3): 29-47.
- Burnouf T, Radosevich M. Affinity chromatography in the industrial purification of plasma proteins for therapeutic use. J Biochem Biophys Methods. 2001; 49(1-3): 575-86.

TRABAJO PRÁCTICO N°5

TÉCNICAS DE PRECIPITACIÓN



OBJETIVOS

- Comprender los distintos tipos de técnicas de precipitación disponibles en el laboratorio inmunológico.
- Conocer el fundamento de cada una de ellas.
- Adquirir habilidades y destrezas en el desarrollo de técnicas de precipitación.
- Informar e interpretar los resultados en el contexto de una situación clínica.
- Conocer la aplicación de las técnicas de precipitación en otras especialidades: Microbiología, Virología, Hematología.

INTRODUCCIÓN

Los diferentes inmunoensayos presentan sensibilidades diferentes y conocerlas, es de gran utilidad a la hora de decidir cuál de ellos utilizar en una situación particular.

TABLE 6-3 SENSITIVITY OF VARIOUS IMMUNOASSAYS

Assay	Sensitivity* (μ g Antibody/ml)
Precipitation reaction in fluids	20–200
Precipitation reactions in gels	
Mancini radial immunodiffusion	10–50
Ouchterlony double immunodiffusion	20–200
Immunoelectrophoresis	20–200
Rocket electrophoresis	2
Agglutination reactions	
Direct	0.3
Passive agglutination	0.006–0.06
Agglutination inhibition	0.006–0.06
Radioimmunoassay	0.0006–0.006
Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA)	<0.0001–0.01
ELISA using chemiluminescence	<0.0001–0.01
Immunofluorescence	1.0
Flow cytometry	0.06–0.006

*The sensitivity depends upon the affinity of the antibody as well as the epitope density and distribution.

SOURCE: Adapted from NR Rose et al, eds., 1986 and 1997 eds., *Manual of Clinical Laboratory Immunology*, American Society for Microbiology, Washington, D.C.

A partir del cuadro anterior se observa que las **reacciones de precipitación**:

- Son las más simples de llevar a cabo en el laboratorio,
- Existen varias pruebas.

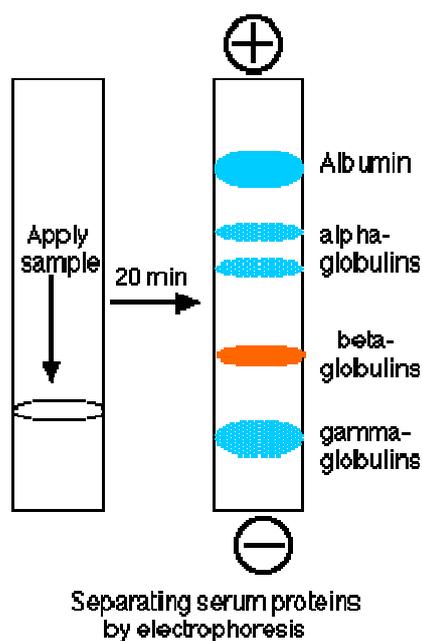
- Se observan fácilmente.
- No requieren equipos costosos.
- Pueden ser cuali o cuantitativas.
- Sin embargo una gran desventaja es su baja sensibilidad.

En general, la técnica de **inmunoprecipitación**:

- ▶ Se caracteriza porque **el antígeno utilizado se encuentra en forma soluble**.
- ▶ Se basa en el hecho de que la mayoría de las proteínas difunden libremente a través de poros de un gel.
- ▶ Hay ausencia de reacción física o química entre los inmunoreactantes y el gel.
- ▶ Al contactarse antígeno y anticuerpo específicos se forma una banda de precipitación en el punto en que ambos alcanzan equivalencia.
- ▶ Sirve para determinar la concentración de Ags o Acs (semi-cuantitativos) o para comparar Ags y evaluar su pureza (cualitativos).

Si bien la electroforesis de proteínas séricas no es un método de inmunoprecipitación, se incluye en las técnicas de laboratorio ya que se lo utiliza en el laboratorio de rutina y a su vez, es el paso previo a la realización de la inmunodifusión en la inmunolectroforesis.

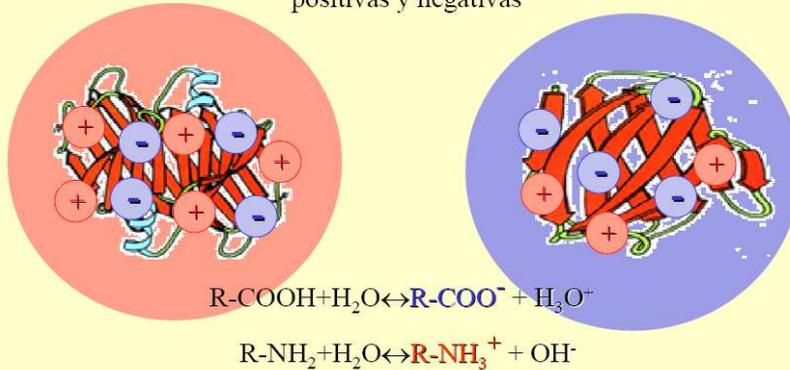
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SÉRICAS



La electroforesis consiste en el movimiento de partículas cargadas por aplicación de un campo eléctrico externo. Este principio se aplica a la separación de las fracciones proteicas del suero.

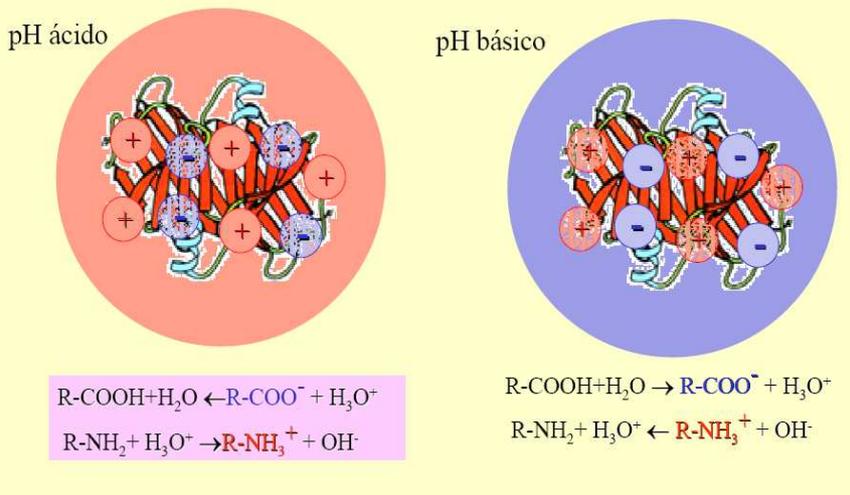
Las proteínas son moléculas anfóteras, es decir, son partículas no cargadas o cargadas positivamente o negativamente dependiendo del pH del medio en que se encuentran. A pH = 8.6, la mayoría de las proteínas séricas tendrán una carga negativa y se separarán en un campo eléctrico de migración hacia el ánodo.

Los grupos funcionales **ácidos** y **básicos** presentes en las cadenas laterales de los aminoácidos, al disociarse en el agua, confieren a la proteína cargas positivas y negativas



La carga neta de una proteína depende de la suma de cargas de ambos signos

La carga eléctrica de la proteína depende del grado de disociación de sus grupos funcionales **ácidos** y **básicos**, lo que depende del pH.



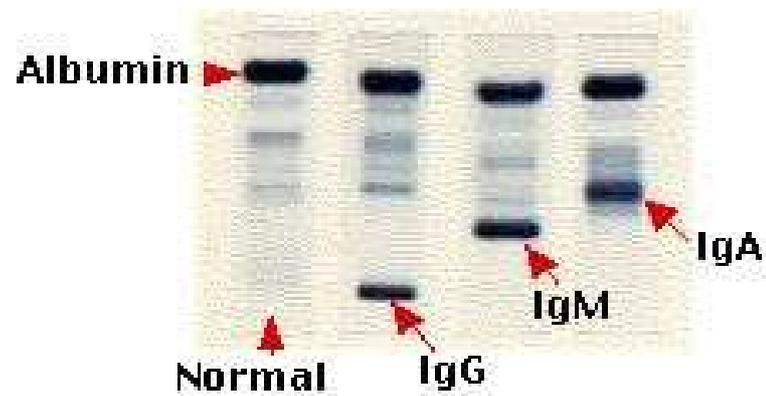
Esta separación se realiza sobre un soporte inerte que no impide ni estimula el flujo de las moléculas en el campo eléctrico. El soporte de acetato de celulosa separa al suero normal en cinco bandas proteicas: albúmina, alfa₁, alfa₂, beta y gama globulinas, donde cada una de estas fracciones electroforéticas representa un conjunto de muchas proteínas. La fracción gama consiste casi completamente en inmunoglobulinas. Además, este soporte es óptimamente transparente y admite microcantidades de proteínas.

Luego de la separación es posible su fijación permanente en la posición a la cual han migrado visualizándose las bandas separadas por tinción con un colorante que presenta afinidad por las proteínas.

El método más común para la determinación cuantitativa de las distintas fracciones proteicas es la tinción luego de su separación y medición por densitometría.

Es esencial el uso de un suero patrón normal en cada corrida electroforética. Actualmente, la separación electroforética ofrece una excelente forma de obtener estimaciones semi-cuantitativas de los niveles de inmunoglobulinas totales en el suero como por ejemplo: Macroglobulinemia de Waldenström o Mieloma Múltiple.

Se pueden emplear esta técnica en otras muestras como plasma, orina, calostro, LCR, leche, entre otros.



INMUNOPRECIPITACIÓN

❖ **Técnicas Cualitativas:**

✓ **En medios líquidos**

✓ **En medios gelosados:**

1. Difusión simple monodimensional

Aplicación: demostración de varios sistemas reactivos simultáneamente. El número de bandas de precipitación nos indica la cantidad mínima de sistemas reaccionantes presentes. Pero debe tenerse en cuenta que en una mezcla de anticuerpos y antígenos, es necesario que las moléculas tengan velocidades de difusión diferentes y no se encuentren a concentraciones inferiores a las necesarias para que la reacción de precipitación ocurra.

2. Difusión simple bidimensional

Aplicación: demostración de varios sistemas reactivos simultáneamente. Puede detectarse hasta 10µg/ml de anticuerpo.

3. Doble difusión o técnica de Ouchterlony

Aplicación: investigación de los componentes de una mezcla antigénica.

Aplicación clínica: búsqueda de anticuerpos contra el complejo ENA: Sm, Rnp, SSA/Ro; SSB/La; búsqueda de anticuerpos contra venenos de víbora.

4. Contrainmunolectroforesis (CIEF)

Aplicación: determinación de la presencia de proteínas electronegativas.

Aplicación clínica: determinación de la presencia de antígeno de superficie del virus de hepatitis B en suero. Actualmente poco utilizada.

❖ **Técnicas semicuantitativas:**

✓ **En medios líquidos**

✓ **En medios gelosados:**

1) Inmunoelectroforesis (IEF) que combina electroforesis en geles de agarosa o cellogel e inmunodifusión.

Aplicación: investigación e identificación de los diferentes componentes proteicos de una muestra sérica a través de arcos de precipitación.

Aplicación clínica: análisis de proteínas para el diagnóstico de gammapatías monoclonales.

2) Inmunofijación

Aplicación: investigación e identificación de los componentes proteicos de una muestra sérica. La ventaja de esta técnica con respecto a la IEF es su mayor sensibilidad y un tiempo corto de obtención de resultados (1 a 2 horas).

Aplicación clínica: análisis de proteínas para el diagnóstico de gammapatías monoclonales.

3) Electroforesis cruzada.

Aplicación: estudio de las proteínas séricas.

❖ **Técnicas cuantitativas:**

✓ **En medios líquidos**

✓ **En medios gelosados**

1) Inmunodifusión radial simple (IDRS)

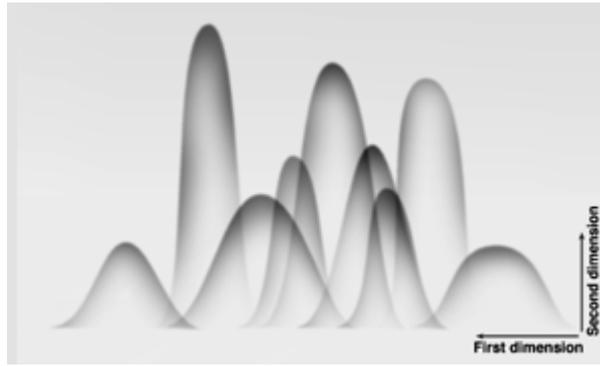
Aplicación: determinación de la concentración de inmunoglobulina en líquidos biológicos.

Aplicación clínica: determinación de la concentración de IgG, IgA e IgM en suero y de IgA secretoria en saliva.

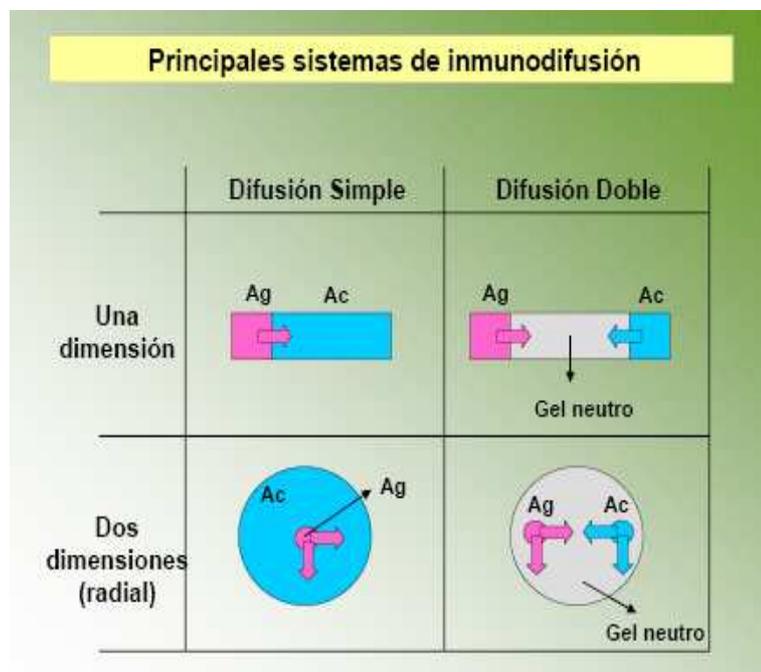
2) Electroinmunodifusión o “rocket” electroforesis.

Aplicación: cuantificación de proteínas electronegativas en fluidos biológicos.

Aplicación clínica: determinación de la concentración de albúmina en orina de pacientes con enfermedades renales.



Resumiendo:



1. ELECTROFORESIS EN ACETATO DE CELULOSA (CELLOGEL)

OBJETIVOS

- Separar e identificar los distintos componentes proteicos en una muestra de suero / orina realizando un proteinograma electroforético.
- Evaluar las distintas bandas obtenidas por el *método visual*, estimando los porcentajes relativos de cada una de ellas, así como su concentración a partir del dato de proteínas totales, las que se determinan por el método de Biuret.
- Relacionar los patrones electroforéticos obtenidos con las distintas patologías.

INTRODUCCIÓN

Es un método para fraccionar mezclas proteicas, tal como lo es el suero sanguíneo, como las moléculas tienen distinta movilidad cuando son sometidas a la acción de un campo eléctrico, separándose en fracciones. **El buffer o tampón que se use para la corrida es fundamental, porque de él va a depender la carga neta de las moléculas.** Otros factores importantes son el tamaño de la molécula, la intensidad de corriente utilizada y la temperatura.

Nota: No es que las proteínas en realidad tengan carga, tienen carga neta cero en su punto isoeléctrico, pero a determinado pH hay grupos ionizables principalmente COO^- y NH_3^+ que le dan esa carga necesaria para el fraccionamiento.

MATERIALES Y MÉTODO

1. **Muestra utilizada:** puede ser una muestra sérica o cualquier líquido biológico, libre de hemólisis y contaminación. En el caso de muestras diferentes a la sérica, las mismas son obtenidas por lo general por personal médico y deben ser remitidas en condiciones apropiadas al laboratorio para su procesamiento.

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA SÉRICA CON JERINGA Y AGUJA

La sangre se extrae de una vena: radial, basílica o cefálica, usualmente de la parte interior del codo o del dorso de la mano. En función del tipo de análisis que se

vaya a realizar, es requisito haber suspendido el consumo de alimentos al menos ocho horas antes de la extracción; aunque este caso siempre lo ha de determinar el médico en el momento en que solicita dicha prueba.

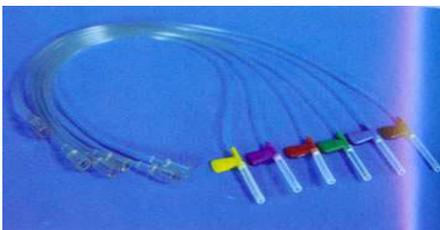
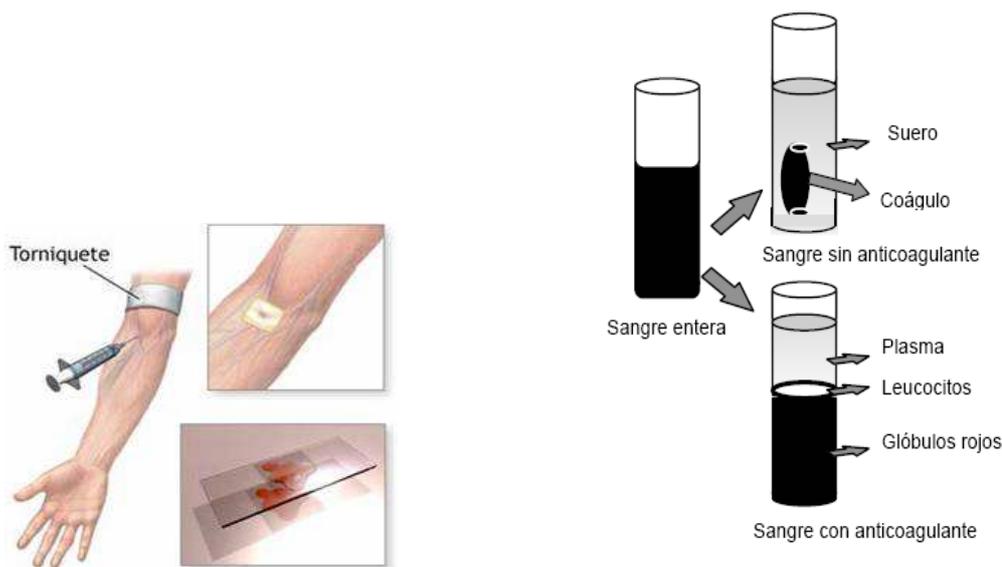
MATERIALES

- Jeringa de distintas capacidades.
- Agujas intravenosas o sistemas vacutainer (de vacío).
- Compresor o goma elástica.
- Algodón o gasa estéril.
- Alcohol.
- Recipientes adecuados.

TÉCNICA

- Colocar al paciente en posición adecuada, tumbado o sentado, si está sentado la silla debe tener respaldo y brazo, y nunca se hará de pie.
- Se coloca el brazo extendido sobre el soporte o apoyabrazo, sino disponemos de soporte se puede apoyar sobre una mesa.
- Colocar el torniquete de 8 a 10 cm por encima del lugar de la punción, esto dificulta el retorno venoso hinchando las venas y por tanto mejorando su palpación.
- Después de colocar el torniquete se le dice al paciente que abra y cierre la mano fuertemente y finalmente que cierre el puño fuerte.
- Examinamos exhaustivamente las venas, visualizando la zona y palpándola y debemos elegir por palpación.
- La palpación se hace con los dedos índice y medio de manera que notemos el recorrido de la vena.
- Una vez localizada la vena limpiamos la zona con alcohol y se deja secar sin soplar.
- A continuación comprobamos el émbolo de la jeringa, tiramos de él para ver que no está pegado y lo empujamos hasta el fondo de manera que no quede aire.
- Situamos la aguja en la jeringa con el bisel hacia arriba y la situamos aproximadamente 20° sobre la piel, al mismo tiempo con la mano izquierda tiramos de la piel por debajo del brazo con el objeto de fijar los tejidos.

- La vena se debe puncionar por debajo de donde es visible, se debe puncionar de un solo golpe rápido y enérgico, pero no de forma brusca.
- Las agujas más utilizadas son: 16/5 y 25/8 y la jeringa de 2,5 y 10 ml.
- Sabemos que hemos llegado a la vena, porque el cono de la jeringa se llena automáticamente de sangre, entonces aspiramos con el émbolo, extraemos suavemente la cantidad necesaria de sangre. Una vez extraída la sangre decimos al paciente que abra la mano para descomprimir la vena.
- Una vez terminada la extracción y antes de extraer la aguja se debe quitar el compresor.
- Quitamos la aguja y colocamos en el punto de punción un algodón o gasa estéril ejerciendo presión sobre el punto de punción.
- Una vez acabada la extracción repartimos la sangre en los recipientes sin aguja. La aguja no se encapucha sino que se tira en un contenedor.



En el caso de tener que realizar la extracción en pediatría, neonatología o en pacientes con venas dificultosas, se puede utilizar las agujas con alas de “mariposa”.

TÉCNICA DE EXTRACCIÓN DE LA MUESTRA SÉRICA CON TUBO AL VACÍO (VACUTAINER)



CODIGO de COLOR	ADITIVO	MUESTRA	ANALISIS
 Rojo	Sin Aditivo	Suero	Química Serología
 Rojo/Gris  Amarillo Tapa Hemogard	Gel/Sin Aditivo	Suero	Química Serología
 Celeste	Citrato	Plasma	Coagulación
 Lila	EDTA	Plasma	Hematología
 Verde	Heparina	Plasma	Química Serología
 Negro	Citrato	Plasma	V.H.S.
 Gris	Fluoruro	Plasma	Glucosa

MATERIALES Y MÉTODO

- **Tubos para la extracción**

Seleccionar el tubo apropiado según las determinaciones a realizar.

- **Agujas con dispositivo para extracción de sangre al vacío**

- N° 21 para adultos.
- N° 22 para niños y neonatos.
-

De preferencia, ambas de bisel corto para evitar la coagulación.

De la calidad de la toma de muestra dependerá el resultado de nuestro análisis; muestras hemolizadas llegan a alterar algunos analitos.

- **Técnica**

1. Verificar que los elementos por utilizar estén listos, y que el paciente se sienta cómodo.
2. Se retira el estuche protector de la aguja y éste se enrosca al dispositivo para extracción de sangre al vacío.
3. Colocar la ligadura cuatro dedos por encima de la flexión del codo o 10 cm por encima de éste y pedir al paciente que abra y cierre la mano varias veces, para favorecer la dilatación de las venas.
4. Una vez escogida la vena, desinfectarla con una pieza de algodón embebido en etanol al 70%.
5. Se coloca la aguja en dirección paralela a la vena, se perfora la piel haciendo avanzar la aguja entre 0,5 cm y 1 cm en el tejido subcutáneo, se inserta el tubo al vacío por la parte posterior y no preocuparse por la cantidad de sangre extraída ya que el mismo sonido del vacío avisará que la extracción terminó.
6. Si pincho y no sale sangre puede ser debido a:
 - Pinchar al lado de la vena pero no la vena
 - Pinchar superficialmente
 - Pinchar la vena pero atravesada
7. Retirar la ligadura tirando del extremo doblado.
8. Colocar un pedazo de algodón seco sobre la parte donde se encuentra oculta la aguja. Sacar la aguja con un movimiento rápido y depositarla en el recipiente de metal con desinfectante.
9. Pedir al paciente que presione firmemente el algodón durante 3 minutos, con el brazo extendido. No se recomienda que se flexione el brazo a causa del riesgo que se forme un hematoma.
10. Mezclar por inmersión suave la sangre (cuando el tubo colector tiene anticoagulante).

CUIDADOS DEL PACIENTE DESPUÉS DE LA PUNCIÓN

- Si la hemorragia de la punción continúa durante un tiempo prolongado, eleve el área y aplique una curación con presión. Observe al paciente y verifique si no ha ingerido anticoagulante o ácido acetilsalicílico. Si el paciente se mareo o

tiende al desmayo, haga que coloque la cabeza entre las rodillas o se acueste y pídale respirar profundamente. Aplique una toalla fría en la cabeza o parte posterior del cuello. En caso que permanezca inconsciente, notifique de inmediato al médico tratante.

- Los hematomas se previenen con una técnica adecuada que consiste en evitar que la aguja atraviese la vena, liberar el torniquete antes de extraer la aguja, aplicación de suficiente presión sobre el sitio de la punción y al mantener la extremidad extendida hasta que se detenga la hemorragia.

AVISO CLÍNICO

- No extraiga sangre de la misma extremidad utilizada para la administración intravenosa de medicamentos, líquidos o transfusiones. Si no existe otro sitio disponible, asegúrese que la punción venosa se localiza por debajo del catéter IV. Evite las áreas edematosas, paralizadas o el mismo lado de una mastectomía, al igual que las infecciones y problemas cutáneos. La punción venosa causa infección, alteraciones circulatorias o retraso en la cicatrización.
- El torniquete prolongado provoca estasis y hemoconcentración.



2. **Una fuente** de poder estabilizada capaz de suministrar 0-400 voltios y 0 -50 mA.
3. **Una cuba electroforética** (ver foto) comercial, pero puede fabricarse fácilmente con acrílico, son dos compartimentos separados sobre la separación va montado un puente de acrílico también donde se monta el cellogel.
4. **Aplicadores o sembradores** comerciales o pueden estar hechos en forma casera con una aguja de hipodérmica de las gruesas, con el dremel se rebaja la cánula hasta dejarla media caña (ver foto), tiene un tamaño de 0.7 cm; por cada tira de 2,5 cm de ancho largo dos siembras de la misma muestra, una para observar e interpretar y la otra para presentar en el informe.



5. Reactivos

Tiras de cellogel de 2,5 x 14 cm; se comercializan en sobres que contienen metanol, una vez abiertas deben conservarse en un recipiente con metanol al 40%, si se secan no sirven más.

Buffer: puede utilizarse buffer comercial o bien preparado en el laboratorio.

- Veronal sódico 0,04 M: 8,24 g de veronal sódico, agua destilada csp 1.000ml; pH 9,2.
- Veronal – veronal sódico:

Veronal (g)	Veronal sódico (g)	Agua destilada csp /ml	pH
4,90	17,40	1.000	8,4
3,41	18,95	1.000	8,6
2,34	20,62	1.000	8,8

El buffer se puede usar muchas veces, una vez hecha la corrida se guarda en un frasco bien tapado para la próxima, el único problema es que puede contaminarse con hongos.

Solución colorante y decolorante:

Colorante			Decolorante
Punceau S 500 mg	Tricloroacético al 5% 100 ml		Ácido acético al 5% en agua corriente
Amidoschwartz 500 mg	Metanol 45 ml	Ácido acético 10 ml	Agua destilada 45 ml
			Metanol 475 ml+ ácido acético 50 ml+ agua destilada 475 ml

Solución transparentizadora:

Metanol..... 85 ml

Acido acético.....14 ml

Glicerina..... 1 ml

6. PROCEDIMIENTO

- Las tiras de cellogel se conservan en metanol al 40%. Secarlas bien y sumergirlas en la solución buffer por 10 minutos, retirarlas, escurrirlas sobre dos hojas de papel de filtro y extenderlas sobre el puente de la cuba electroforética. Dejar 2-3 minutos para que las tiras se vuelvan más absorbentes. Es importante tener en cuenta que el *lado absorbente* de la tira es aquél que presenta el chanfle abajo, a la derecha (ver figura).

- A continuación, empleando el sembrador comercial (semi-micro: 1,5 μ l) / casero o micropipetas de 1 μ L, se siembran las diferentes muestras de suero que se quieren valorar. Las muestras se siembran a 1 cm de distancia del cátodo y separadas entre sí por 0,8 cm. Para visualizar mejor la zona de la siembra es recomendable colorear las muestras con azul de bromofenol; sin embargo también se puede utilizar un suero ictérico como marcador de corrida o bien trabajar con un buffer de electroforesis que incluya dicho marcador.
- Una vez que las muestras están secas, se hace pasar la corriente eléctrica, que será de 2,5 mA por tira o 200 voltios (independiente del número de muestras sembradas), durante aproximadamente 30 minutos.
- Finalizada la corrida, se introducen las tiras en la solución colorante elegida durante 5-10 minutos (dicho colorante puede recuperarse) y luego se decoloran hasta la perfecta visualización de las bandas. El decolorante utilizado dependerá del colorante empleado; descartarse después de cada lavado.
- Para conservar las tiras se debe transparentizar utilizando la solución correspondiente. Sumergir la tira en la solución recién preparada, dejar 5 minutos y luego colocarla bien estirada sobre un portaobjeto; dejar unos minutos en la estufa de secado, hasta observar que la misma se vuelva transparente.
- Observar e interpretar las bandas coloreadas. Informar.

7. INTERPRETACIÓN

Las proteínas presentes en el plasma son la albúmina, las globulinas y el fibrinógeno. Estas pueden ser separadas por métodos químicos y determinando la cantidad de cada una de ellas se obtiene la relación Albúmina – Globulina (parámetro característico para cada especie animal). La albúmina, el fibrinógeno y la mayor parte de las globulinas son sintetizados por el hígado a excepción de las γ -globulinas que se sintetizan en tejidos extrahepáticos. La albúmina y globulinas presentes en el plasma pueden fraccionarse por electroforesis lo que ha ayudado en la identificación de aproximadamente 22 fracciones, muchas de las cuales son subconjuntos de globulinas y se las ha agrupado en: albúminas, α -globulinas, β -globulinas y γ -globulinas.

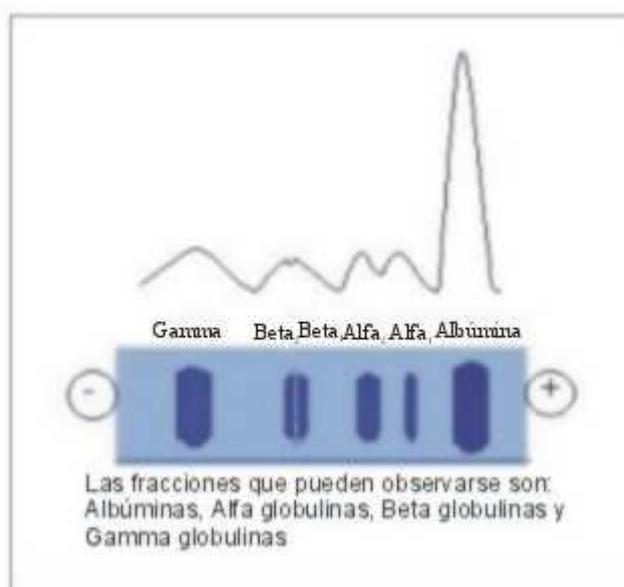
La determinación de proteínas totales es un examen que permite conocer la concentración de proteínas totales en el suero.

Los medicamentos que pueden interferir en las mediciones de proteína total incluyen iones de amonio, estrógenos, drogas hepatotóxicas y anticonceptivos orales.

Si el valor de las proteínas totales estuviera fuera del rango normal para la especie, se deben realizar más exámenes para identificar la fracción involucrada en el aumento o disminución de este parámetro para luego identificar la proteína cuyo valor esta alterado. Esto se logra mediante la realización de un **proteinograma electroforético**. Puede realizarse por métodos manuales y/o automatizados, según la estructura y el volumen de trabajo de cada laboratorio.

¿Es un *método cualitativo o cuantitativo*? Según el Comité Internacional de Expertos: “No se recomienda la densitometría como método cuantitativo” y además expresa: “*La inspección visual de un proteinograma realizado por una persona entrenada, permite efectuar una evaluación semi-cuantitativa de las diversas fracciones proteicas, que dan una información clínica, que no se obtiene de otra manera*”.

Esta es una prueba de laboratorio que permite separar las proteínas presentes en la sangre: ALBÚMINA y GLOBULINAS (α , β y γ).



La **prealbúmina** y la llamada **proteína transportadora de retinol** son proteínas que duran sólo unas horas en circulación antes de degradarse y participan fundamentalmente en el transporte de hormonas (no aparecen en el proteinograma electroforético).

La **albúmina** es una proteína sintetizada en el hígado, permanece en circulación unos diecinueve días, hasta que es metabolizada en los tejidos para los que es fuente de aminoácidos. Se encuentra en mayor concentración en el plasma sanguíneo constituyendo el 50-60% del total de las proteínas plasmáticas. Sus funciones más importantes guardan relación con su tamaño, que la mantiene dentro del torrente circulatorio, contribuyendo a transportar moléculas de pequeño tamaño (ácidos grasos, bilirrubina, calcio, progesterona, drogas, etc.). Es la más homogénea, soluble, estable y de mayor movilidad electroforética de todas las proteínas plasmáticas. También es de vital importancia para el mantenimiento de la presión oncótica de la sangre (la presencia de un valor normal de albúmina en sangre impide el pasaje de agua desde la sangre a los tejidos). La molécula de albúmina ofrece una superficie total importante para la absorción de tóxicos lo que les otorga la capacidad de unirse a muchos iones (cobre, zinc y cadmio por ejemplo), y otros compuestos para que estos puedan ser transportados. También transporta dinitro- y ortocresoles, los derivados nitro- y halogenados de hidrocarburos aromáticos y los fenoles, por lo que la albúmina contribuye al proceso de detoxificación del organismo fijando estas sustancias tóxicas para su eliminación de los tejidos. Por otra parte el zinc por ejemplo, que es un oligoelemento importante para el organismo por su participación en numerosos aspectos del metabolismo celular, es transportado a los tejidos en un 70% por la albúmina.

Las globulinas alfa y beta son las fracciones de proteínas plasmáticas más heterogéneas y están constituidas fundamentalmente por glucoproteínas y lipoproteínas.

Las **α -globulinas** comprenden a un elevado número de proteínas constituidas fundamentalmente por:

α_1 -globulinas:

- Lipoproteínas: las HDL α -lipoproteínas de alta densidad constituidas aproximadamente por un 50% de proteínas y el otro 50% por lípidos: fosfolípidos y colesterol, que tienen como función el transporte de colesterol (desde los tejidos periféricos al hígado) y de vitaminas liposolubles.
- La α_1 -glucoproteína ácida (AAG) es sintetizada por el hígado.
- Globulina fijadora de tiroxina, que es una proteína de unión a hormonas tiroideas para su transporte en sangre.

- α_1 -antitripsina (α_1 AT), glucoproteína sintetizada en el hígado que constituye el 80% de la α_1 - globulina sérica, y junto a otras antiproteasas del suero es importante para la inactivación de enzimas proteolíticas liberadas por los leucocitos en el pulmón.

α_2 -globulinas:

- La α_2 -protrombina actúa como factor en la coagulación. Se transforma en trombina durante el proceso de coagulación y es producida por el hígado.
- Haptoglobinas que son glucoproteínas que se unen fuertemente a la hemoglobina proveniente de la hemólisis intravascular, para prevenir la excreción del hierro por parte del riñón y son producidas por el hígado.
- α_2 - macroglobulina es una glicoproteína (5% de carbohidratos), su síntesis se realiza en el hígado y tiene como función la inhibición de proteasas por formación de complejos con diversas proteasas séricas: tripsina, plasmina, kalikreina. Su papel en la fibrinólisis se basa en inhibir el exceso de plasmina.
- La ceruloplasmina es una fracción proteica constituida por gluco-metaloproteínas cuya función es transportar el cobre.

Las **β -globulinas** están constituidas fundamentalmente por:

- La transferrina (Tf): es una glicoproteína transportadora de hierro (Fe^{3+}), sintetizada y metabolizada principalmente en los hepatocitos. Cerca del 65% del hierro corporal se encuentra en los glóbulos rojos y alrededor del 4% en el músculo esquelético (mioglobina). Aproximadamente el 30% del hierro corporal se encuentra almacenado en el hígado, médula ósea y el bazo; mientras que un porcentaje pequeño del hierro corporal se encuentra transportándose entre varios compartimientos del cuerpo o como componente de proteínas celulares en todo el cuerpo. El hierro se conserva eficientemente, de manera que sólo una pequeña cantidad del mismo se pierde cada día por la orina. El hierro sérico, tal como se mide en un laboratorio clínico, es realmente hierro férrico asociado a la transferrina (dos iones férricos por cada molécula de transferrina).
- Lipoproteínas: esta fracción de las globulinas transporta β -lipoproteínas (LDL).
- Proteínas vinculadas al sistema del complemento.

- Plasminógeno: que es una glicoproteína con un 2% de carbohidratos, que se sintetiza en el hígado.
- Plasmina se genera por activación del plasminógeno.

Las γ -globulinas están constituidas por varias fracciones A, G, M, E y D, y son las responsables de la 'respuesta inmune'. Esta involucra la producción de un grupo complejo de moléculas llamadas anticuerpos o inmunoglobulinas, que son sintetizadas por las células plasmáticas.

En *caninos*, generalmente se observan las mismas fracciones que en humanos, sí bien en proporciones diferentes. Por ejemplo, el contenido de albúmina es superior al de globulinas (al igual que en humanos). En otras especies como el equino o el bovino esta relación se invierte.

PROTEINAS PLASMATICAS Y SU SIGNIFICADO CLÍNICO

Proteína	Significado Clínico	
Albúmina	DISMINUYE en inflamación aguda o crónica Infecciones bacterianas, necrosis tisular, enfermedad hepática, malnutrición, quemaduras por calor, ciertos estados hipermetabólicos de origen hormonal y en la dilución por fluidos intravenosos.	AUMENTA en deshidratación. En LCR en meningitis bacteriana síndrome de Guillain Barre o trauma
Alfa 1 Glico proteína ácida	DISMINUYE en malnutrición, daño hepático severo, en estrógenoterapia (embarazo y anticonceptivos) inflamación y trauma. gastroenteropatías con pérdida de proteínas	AUMENTA en necrosis tisular,
Alfa 1 anti-Tripsina	DISMINUYE en deficiencias congénitas, distress respiratorio idiopático de la infancia, hepatitis neonatal severa y enfermedad de hígado y páncreas	AUMENTA en necrosis tisular, inflamación y trauma. Enfermedades malignas. Estrógenoterapia (embarazo y anticoncepción)
Alfa 2 Macro Globulina	DISMINUYE en activación de proteasas, pancreatitis, y úlceras pépticas.	AUMENTA en estrógenoterapia, embarazo, defectos del tubo neural, diabetes, hepatitis, cirrosis, Síndrome de Down.

Antistreptolisina 0	DISMINUYE en ausencia de infección estreptocócica. En 6-12 meses vuelve a niveles preinfección	AUMENTA en 80% de pacientes con faringitis estreptocócica no tratada. 85-90% de pacientes con fiebre reumática aguda, 50% de pacientes con glomerulonefritis postinfección por estreptococo.
Antitrombina III	DISMINUYE en deficiencias congénitas, trasplante hepático, cirrosis, carcinoma, falla renal crónica.	AUMENTA en hepatitis aguda, trasplante renal, inflamación, déficit de vit.K y en la menstruación.
Apolipoproteína A-I	DISMINUYE en hipo alfa lipoproteinemia, diabetes no controlada, hipertrigliceridemia, enf. cardíaca prematura, falla renal crónica, dieta rica en grasas poliinsaturadas y habito de fumar.	AUMENTA en la hiper-alfa lipoproteinemia familiar, y en la pérdida de peso.
Apolipoproteína B	DISMINUYE en deficiencia de alfa-lipoproteína, hipertiroidismo, malnutrición, enfermedad coronaria crónica, dieta rica en grasas poliinsaturadas.	AUMENTA en la hiper alfa lipoproteinemia, enf. coronaria prematura, diabetes y falla renal.
Proteína C Reactiva	DISMINUYE en niños con relación a adultos. No se conocen causas de disminución.	AUMENTA en Inflamación trauma, necrosis tisular, artritis reumatoide. Lupus eritematoso sistémico, infarto de miocardio y en infección bacteriana.
Ceruloplasmina	DISMINUYE en la degeneración hepatolenticular (enf. de Wilson), malnutrición	AUMENTA en el embarazo (último trimestre duplica el valor) inflamación, malignidad y trauma.
Complemento C3	DISMINUYE en malnutrición proteica severa, Condiciones congénitas, enf. autoinmunes, artritis reumatoide, bacteriemia, Gram (-) y quemaduras.	AUMENTA en muchas condiciones inflamatorias, obstrucciones biliares y amiloidosis.
Complemento C4	DISMINUYE En enfermedades adquiridas o congénitas, LES, artritis reumatoide, angioedema hereditario, glomerulonefritis, enfermedades autoinmunes, quemaduras por calor.	AUMENTA en reacciones de fase aguda y en ciertas enfermedades malignas
Fibrinógeno	DISMINUYE: Enfermedad hepática, hiperfibrinólisis, malignidad y afibrinogenemia	AUMENTA: en inflamación

Haptoglobina	DISMINUYE en anemias hemolíticas, enfermedad hepatocelular crónica, reacciones transfusionales, malaria talasemia y homoglobinopatías	AUMENTA en corticoterapia, inflamación, obstrucción biliar y destrucción tisular
Transferrina	DISMINUYE: malnutrición, hipoalbuminemia, inflamación síndrome nefrótico, déficit genético, y hepatopatías	AUMENTA: Deficiencia crónica de Fe, Anemias, hipotiroidismo y embarazo.
Inmunoglobulina A policlonales	DISMINUYE en la deficiencia congénita de IgA (ataxia, telangiectasia).	AUMENTA en gammopatías Enfermedad crónica del hígado, infecciones, neoplasias del tracto gastrointestinal bajo, gammopatías monoclonales, mieloma a IgA y linfomas.
Inmunoglobulina E	DISMINUYE en algunos casos de neoplasmas avanzados, agammaglobulinemia e hipersensibilidad	AUMENTA en gammopatías policlonales, ciertas enf. alérgicas, asma fiebre del heno, gammopatías monoclonales, mieloma a IgE.
Inmunoglobulina G	DISMINUYE déficit de síntesis anticuerpos, corticoides. Gammopatías no IgG.	AUMENTA en toda respuesta de anticuerpos. Mieloma IgG, hepatopatía crónica, infección crónica, enf. del colágeno.
Inmunoglobulina M	DISMINUYE Hipogammaglobulinemia congénita Waldeström, o adquirida. Deficiencia selectiva de IgM o en gammopatías no IgM	AUMENTA en la Macroglobulinemia. Respuesta inmune, infecciones por virus bacterias y parásitos, cirrosis biliar primaria.

2. INMUNOELECTROFORESIS

OBJETIVO

- Evaluar la presencia de los distintos constituyentes antigénicos de una muestra (suero humano, orina, LCR) e identificarlos por su reacción con los anticuerpos específicos en base a su movilidad.
- Observar con atención las características de cada banda ya que pueden orientar respecto a la *concentración* del componente correspondiente y a su clonalidad.

INTRODUCCIÓN

Grabar y Williams idearon un método analítico que permitía separar los componentes presentes en una muestra proteica, al que llamaron *análisis*

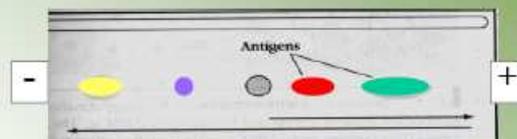
inmunoelectroforético y que resulta de gran valor para los exámenes inmunoserológicos e inmunoquímicos.

La inmunoelectroforesis es un procedimiento que combina dos métodos de separación de proteínas: la electroforesis y la inmunodifusión.

En un primer paso las proteínas se separan en un gel de agar o en cellogel de acuerdo a la densidad de cargas eléctricas por exposición a una diferencia de potencial. Después de la separación electroforética, las proteínas reaccionan por doble difusión con un antisuero adecuado, colocado en una canaleta paralela a la dirección de migración electroforética y a una distancia conveniente. Los anticuerpos se unen con sus correspondientes antígenos y dan en el gel bandas de precipitación específicas, generalmente en forma de arcos. De acuerdo a esto es posible contar el número de constituyentes antigénicos de una mezcla e identificarlos por su reacción con los anticuerpos específicos en base a su movilidad.

Paso 1: Electroforesis

Las proteínas cargadas negativamente (en buffer alcalino) son sometidas a un campo eléctrico → se separan en un gel de agar de acuerdo a su carga eléctrica.

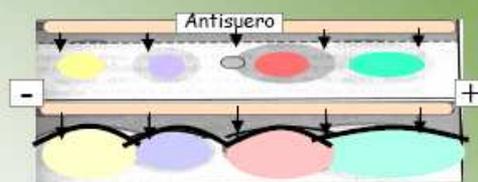


Consideraciones:

Fenómeno de ELECTROENDÓSMOSIS: las proteínas poco cargadas son desplazadas en sentido contrario a su migración electroforética real.

Paso 2: Inmunodifusión

Las proteínas cargadas negativamente (en buffer alcalino) son sometidas a un campo eléctrico → se separan en un gel de agar de acuerdo a su carga eléctrica.



Aplicaciones

En laboratorios clínicos se utiliza para detectar presencia o ausencia de proteínas séricas, en el diagnóstico de Gammopatías. Investigar e identificar los componentes de una muestra antigénica.

En el laboratorio, se puede realizar la IEF utilizando como soporte agarosa, tal como se detalla a continuación o bien **tiras de cellogel** (las mismas utilizadas para el proteinograma electroforético).

MATERIALES Y MÉTODO

- Antígeno: suero humano o animal libre de hemólisis
- Anticuerpos: suero de conejo anti-suero humano o animal (antiglobulina)
- Suero patrón
- Gel de agar (agarosa 1%)
- Tampón veronal (pH = 8.6)
- Solución fisiológica
- Solución colorante: a) Amido Schwartz 0.5% P/V; b) Ponceau S.
- Solución decolorante: metanol y ácido acético o ácido acético al 5%, según el colorante utilizado.
- Portaobjetos
- Micropipetas y tips
- Papel de filtro
- Espátula
- Baño María
- Equipo de electroforesis: cuba, fuente de poder, molde para perforar el agar y perforador de 2 mm de diámetro.
- Cámara húmeda

a) Mezclar 1g de agarosa con 100ml de tampón veronal.

b) Luego de fundir a Baño María colocar 7ml sobre el portaobjetos. Dejar solidificar.

c) Practicar los pocillos para el antígeno y marcar en el canal de 2mm de ancho (para el suero que estará paralelo a las proteínas separadas).

d) Llenar ambos compartimientos de la cuba con 70ml del buffer.

e) Colocar 15µl del antígeno en su pocillo y llevar el portaobjetos sobre el aparato de electroforesis.

- f) Colocar una tira de papel del filtro a modo de puente para que la solución buffer de la cuba haga contacto con el gel de agar sobre el portaobjetos.
- g) Tapar la cuba y conectar la fuente de poder aplicando una corriente de 10mA y realizar la corrida electroforética hasta que la albúmina marcada esté a 2cm del punto de siembra.
- h) Retirar el portaobjetos de la cuba, extraer el agar del canal con espátula y coloca al ras el antisuero correspondiente (100 a 200 μ l).
- i) Incubar a temperatura ambiente durante 24-48hs. Dejar difundir y leer los resultados.

3. SEPARACIÓN DE PROTEÍNAS POR ELECTROFORESIS SDS-PAGE

OBJETIVO

Evaluación y separación de las proteínas plasmáticas por técnica de SDS-PAGE

INTRODUCCIÓN

Es un método analítico de alto poder resolutivo que combina la migración en un campo eléctrico y el tamizado molecular a través de un gel de corrida.

En estos geles pueden conseguirse poros de diferentes diámetros, lo cual es fundamental, según las condiciones de la polimerización. Como consecuencia, para un gel de determinado poro, el tamaño molecular y la carga neta serán los factores determinantes de la separación de las moléculas de una mezcla.

Su formación resulta de la polimerización en largas cadenas de acrilamida monomérica y de su entrecruzamiento por intermedio de la N,N'-metilenbisacrilamida corrientemente designada bisacrilamida. El poro del gel formado dependerá de las concentraciones relativas de ambos reactivos durante la polimerización.

La polimerización de la acrilamida necesita de un iniciador del proceso. Los más comúnmente usados son el persulfato de amonio y la riboflavina. Se añade, además, como acelerador, N,N,N',N'-tetrametiletilendiamina (TEMED). En el sistema persulfato de amonio-TEMED, este último cataliza la formación de radicales libres a partir del persulfato, lo que en definitiva inicia la polimerización. En este mecanismo interviene la base libre TEMED, por lo que la acidificación retarda la polimerización.

Cuando se usa riboflavina, para que la polimerización se inicie se requiere luz; ésta, origina radicales libres al fotodescomponer la riboflavina. El oxígeno inhibe la polimerización.

Puede efectuarse en tubos o en placas. En nuestro caso, utilizaremos una placa, que posee la ventaja de poder analizar distintas muestras a la vez. Este procedimiento resulta útil para separar proteínas de una mezcla.

La electroforesis en geles de poliacrilamida puede desarrollarse también usando soluciones buffer que contienen sustancias disociantes, en especial detergentes no iónicos como dodecilsulfato de sodio (SDS). Las proteínas a analizar son hervidas a 100° C en presencia de un exceso de SDS y 2-mercaptoetanol. En esas condiciones el tiol rompe los puentes disulfuro que pudieran existir y el agente desnaturalizante hace que la proteína se desdoble en sus polipéptidos constitutivos, los que fijan SDS. A causa de ello la carga intrínseca del péptido se hace insignificante ante el exceso de carga negativa del SDS; como consecuencia, la carga de todas las moléculas será prácticamente idéntica. Su desplazamiento en un campo eléctrico, en el que el soporte de corrida es un gel de determinada porosidad, dependerá exclusivamente de su tamaño molecular. Este método, conocido como electroforesis en gel de poliacrilamida en presencia de SDS o SDS-PAGE, permite, por comparación con sustancias de peso molecular conocido que han sido corridas simultáneamente, determinar el peso molecular relativo de los productos en análisis.

MATERIALES

2. Soluciones de reserva

a) Acrilamida-bisacrilamida (30:0,8).

Acrilamida 30 g

Bísacrilamida 0,8 g

Agua destilada csp .:..... 100 ml

Disolver, filtrar y conservar en frasco oscuro a 4° C.

b) TEMED. Conservar a 4° C.

c) Persulfato de amonio al 1,5%. Conviene preparar pequeños volúmenes (10 ml) en el momento de usar.

d) SDS al 10%. Se prepara una solución al 10% en agua (P/V). Conservada a 4° C es estable varias semanas. No conviene preparar grandes volúmenes. Como a bajas

temperaturas cristaliza, es necesario calentar a 37° C antes de su uso.

f) Buffer para gel de resolución. Tris-HCl 3 M, pH 8,8.

g) Solución fijadora: etanol al 10% y ácido acético al 0,5% en agua destilada (200 ml)

h) Solución colorante: Nitrato de plata 0,185% en agua destilada.

i) Solución decolorante: 30 g Hidróxido de sodio, 7,6 ml formol 40% y llevar a 1000 ml con agua destilada.

PROCEDIMIENTO

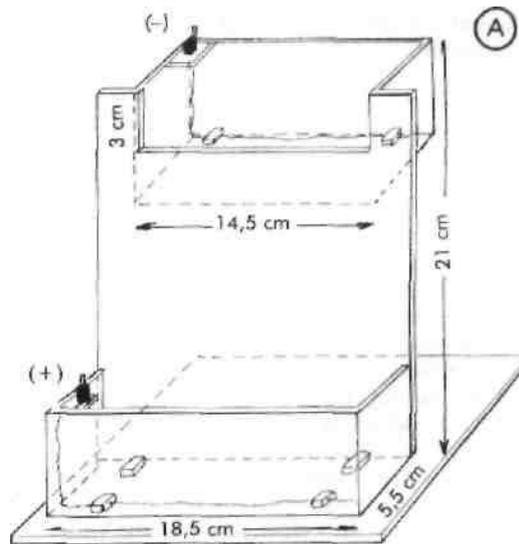
Preparación de la muestra

La muestra debe ser procesada previamente a su análisis, para lo cual será mezclada con un volumen igual de Tris-HCl 0,125 M, pH 6,8, conteniendo 4% de SDS, 10% de 2-mercaptoetanol, 20% de sacarosa y 0,002% de azul de bromofenol. Inmediatamente después se la calienta en baño de agua hirviendo por 3 minutos para desnaturalizar los componentes proteicos de la muestra y se la deja enfriar a temperatura ambiente antes de usar.

Si la corrida en SDS-PAGE va a ser desarrollada junto con patrones de comparación de pesos moleculares conocidos con el objeto de determinar los PM relativos de las muestras en análisis, aquéllos deben ser previamente procesados de la misma manera que lo fueron éstas.

Electroforesis

Se desarrollará en una placa cuyas características pueden observarse en la figura. Para ello se procede a “sembrar” las muestras en cada espacio o “calle” del gel, el cual se somete a 100 v (45mA) hasta que el colorante marcador del frente de corrida llegue a la posición deseada.



Tinción y Revelado:

Tinción argéntica. Si se desea aumentar la sensibilidad para la detección de proteínas, se puede realizar una tinción con nitrato de plata, de acuerdo con el método que se describe:

1. Finalizada la electroforesis colocar el gel de poliacrilamida en un recipiente con 200 ml de solución fijadora etanol al 10% y ácido acético al 0,5% en agua destilada, durante 30 minutos.
2. Colocar el gel de poliacrilamida en 200 ml de solución de tinción, durante 1 hora.
3. Lavar rápidamente con agua destilada, repitiendo la operación.
4. Agregar 200 ml de solución reveladora y agitar suavemente hasta aparición de bandas.

La tinción argéntica permite detectar hasta 10 ng de proteína por banda.

Nota: Se debe trabajar con guantes descartables para evitar impregnaciones exógenas del gel. Los recipientes a usar deben estar bien limpios y enjuagados con agua destilada.

Anexo: Determinación del PM

Ello puede hacerse determinando la movilidad relativa de la proteína que interesa midiéndola con referencia a una proteína estándar o a un colorante trazador. Generalmente se hace respecto del colorante marcador que normalmente se incorpora al gel.

$$\text{Movilidad relativa (Rf)} = \frac{\text{Distancia migrada por la proteína}}{\text{Distancia migrada por el colorante}}$$

Si se determina el Rf de diferentes péptidos de PM conocido, con los datos obtenidos es posible graficar log PM versus Rf. Conociendo el Rf de una sustancia en análisis, puede calcularse su PM relativo o Mr por interpolación en una curva.

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

Paciente de 46 años de edad que concurre al Servicio de Oftalmología del Hospital por presentar alteraciones visuales de 2 meses de evolución. Refiere al momento de la consulta sensación de debilidad, pérdida del apetito y de peso. Comenta mareos frecuentes y sensación de vértigo.

Laboratorio: Hto 25%, Hb 9.1g/l, VSG 95mm en la primer hora, proteínas totales 11,8 g/l. En el proteinograma electroforético se observa componente homogéneo en zona gammaglobulinas de 6,8g/l. En radiografía de tórax no se evidencia destrucción ósea.

En la biopsia de médula ósea se observa infiltración de linfocitos pequeños con diferenciación linfoplasmocitoide y células plasmáticas compatible con linfoma de linfocitos de células pequeñas.

1. ¿Qué es una banda monoclonal? ¿Cómo se diferencia de una oligoclonal y policlonal? ¿Cómo puede estudiarlas en el laboratorio?
2. En este caso clínico ¿considera adecuado realizar una IEF? Justifique
3. Mencionar el fundamento de la Inmunolectroforesis y los diferentes soportes que pueden utilizarse. ¿Qué criterio emplea en la elección del buffer de la corrida electroforética?
4. ¿Qué otras pruebas de laboratorio clínico e inmunológico realizaría para ayudar a orientarse en su diagnóstico? ¿Cuál sería el diagnóstico presuntivo?
5. Considera importante realizar el estudio en orina de 24hs. Justifique
6. El paciente presenta crioglobulinas positivas. ¿Tiene relación con la patología? Justifique.

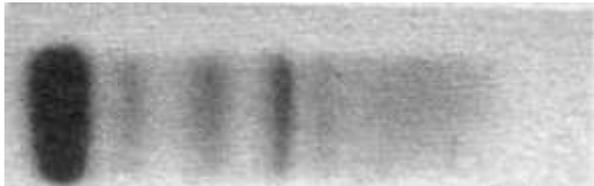
CASO CLÍNICO N° 2

Niño de 9 años que es derivado de un Hospital del Interior a la ciudad de Corrientes, ingresa con edema generalizado, oligoanúrico, hipotenso.

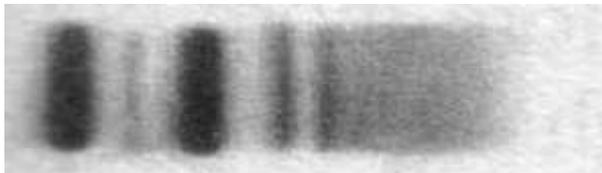
Su laboratorio resulta:

- Uremia = 85 mg%
- Creatininemia= 1.9 mg%
- Calcemia= 6.5 mg% -

- Proteinemia = 3.76 g%
- Albuminemia = 1.8 g%
- Colesterolemia= 490 mg%
- Trigliceridemia= 250 mg%
- Proteinuria= 241 mg / kg / día en orina de 24 hs.
- Proteinograma Electroforético:



Normal



- 1- Interpretar los datos del laboratorio.
- 2- Interpretar la corrida electroforética del paciente, justificando las variaciones observadas de cada una de las fracciones del mismo.
- 3- ¿Qué estudios complementarios de laboratorio realizaría? Justifique en cada caso.
- 4- ¿Cuál sería el diagnóstico más probable?

CASO CLÍNICO N° 3

Paciente de 60 años que acude al médico argumentando tener los siguientes síntomas desde hace un mes: fatiga, malestar en general, falta de apetito, pérdida de peso. Al momento de la consulta presenta ictericia en piel y mucosa, coluria y acolia. Asegura solo ser un bebedor ocasional.

Datos de laboratorio:

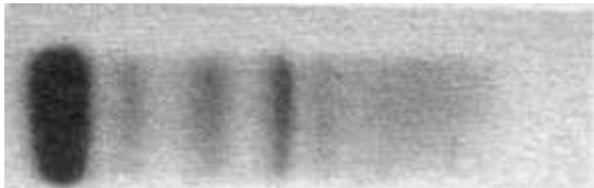
GOT y GPT (elevadas)

GGT y FAL (elevadas)

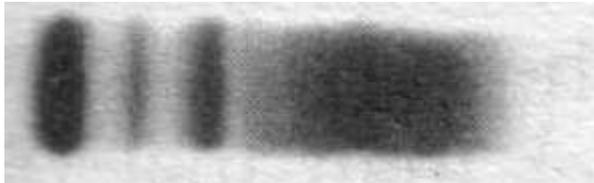
Proteínas totales (normal)

Albumina (levemente disminuida)

Bilirrubina total y bilirrubina directa (aumentadas)



Normal



- 1- Interpretar los datos del laboratorio.
- 2- Interpretar el proteinograma electroforético justificando las variaciones de cada una de las fracciones proteicas.
- 3- ¿Considera necesario realizar otras pruebas de laboratorio? Justifique
- 4- ¿Cuál sería el diagnóstico más probable?

INFORME

- ❖ Esquematizar las semejanzas y diferencias en la separación de proteínas por medio del proteinograma electroforético y SDS-PAGE.
- ❖ Mencionar los patrones electroforéticos en distintas patologías, considerando también aquellas situaciones donde resulta importante realizar el estudio simultáneamente en orina.
- ❖ Mencionar las características más importantes y la utilidad clínica de contrainmunolectroforesis, Rocket e Inmunolectroforesis bidimensional.
- ❖ Mencionar otras técnicas electroforéticas que pueden emplearse en el laboratorio clínico, características y utilidad clínica.
- ❖ Interpretar los casos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Margni, Ricardo. Inmunología e Inmunoquímica. 4º Edición. Editorial Panamericana. Cap. 64: 644-658. 1989.
- Margni, Ricardo. Inmunología e Inmunoquímica. 4º Edición. Editorial Panamericana. Cap. 27: 494-497. 1982.
- <http://es.wikipedia.org/wiki/SDS-PAGE>
- Shapiro AL, Viñuela E, Maizel JV Jr. (September de 1967). “Molecular weight estimation of polypeptide chains by electrophoresis in SDS-polyacrylamide gels”. Biochem Biophys Res Commun. 28 (5): 815-820.
- Weber K, Osborn M (August de 1969). “The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis”. J Biol Chem. 244 (16): 4406-4412.
- Laemmli UK (August de 1970). “Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4”. Nature 227 (5259): 680–685.
- Raymond S, Weintraub L. (1959). “Acrylamide gel as a supporting medium for zone electrophoresis”. Science 130: 711.
- Rüchel R, Steere RL, Erbe EF (1978). “Transmission-electron microscopic observations of freeze-etched polyacrylamide gels”. J Chromatogr. 166: 563-575.
- Ornstein L (December de 1964). Disc Electrophoresis I. Background and theory». Ann N Y Acad Sci. 121: 321-349..
- Davis BJ (December de 1964). «. 2, Method and application to human serum proteins». Ann. New York Acad. Sci 121: 404-427.
- Golgi C (1873). “Sulla struttura della sostanza grigia del cervello”. Gazzetta Medica Italiana (Lombardia) 33: 244–246.

4. DIFUSIÓN SIMPLE BIDIMENSIONAL

OBJETIVO

- Identificar la presencia de una banda de precipitación en la parte central de la zona de reacción.
- Determinar de acuerdo a sus características la relación antígeno – anticuerpo.

INTRODUCCIÓN

Esta técnica, también llamada método de Oudin es una precipitación en tubos, donde se puede demostrar cualitativamente varios sistemas simultáneamente, cosa que no ocurre con la precipitación en medios líquidos. Pueden detectarse hasta 10µg/ml de anticuerpo.

Antígeno y anticuerpo migrarán hacia la zona media y cuando alcancen la zona de equivalencia, interaccionarán y aparecerá la banda de precipitación. Teniendo en cuenta que la difusión está en relación inversa con la concentración de la sustancia que difunde, la banda de precipitación estará más próxima a la zona del antígeno cuando hay exceso de anticuerpo y ocurrirá lo inverso en caso contrario.

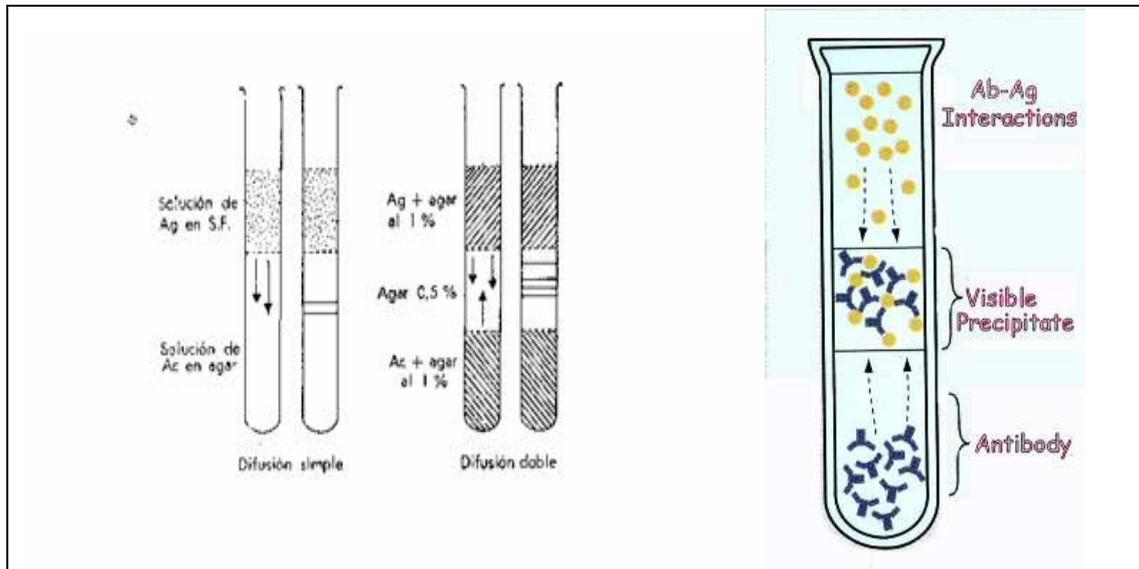
MATERIALES Y MÉTODO

- Agar purificado al 1 % P/V, en solución de cloruro de sodio 0.15M y 0.01% de mertiolate.
- Agar 0,5% en el mismo diluyente.
- Sueros precipitantes o anticuerpos purificados correspondientes.
- Soluciones de antígeno a estudiar.
- Placas de Petri o portaobjetos.
- Pipetas de 1ml.
- Tubos de hemólisis.

En tubos de hemólisis mezclar partes iguales de agar al 1% fundido y enfriado a 50°C y suero precipitante. Transferir 1 ml de la mezcla al tubo de reacción, enfriando rápidamente para que solidifique. Inmediatamente después añadir 0,5 ml de

agar 0,5% fundido y enfriado a 50°C y luego de la solidificación agregar 1 ml de una mezcla en partes iguales de agar al 1% y antígeno.

Después de la solidificación, los tubos tapados para evitar evaporaciones, se dejan a temperatura ambiente 24-48hs para su observación.



5. DOBLE DIFUSIÓN O TÉCNICA DE OUCHTERLONY

OBJETIVO

- Identificar la presencia de bandas de precipitación mediante el empleo simultáneo, en el mismo esquema de reacción, de antígenos y anticuerpos conocidos.
- Identificar la presencia de bandas de identidad total, parcial o no identidad en los sistemas de precipitación utilizados.
- Determinar, según la posición de la banda de precipitación, si en la muestra hay cantidades equivalentes de antígeno y anticuerpo o bien si existe exceso de uno de ellos.
- Determinar, según la forma de la banda de precipitación, las relaciones de pesos moleculares del sistema de precipitación utilizado.
- Determinar, según la cantidad de bandas de precipitación observadas, si la muestra en estudio presenta una composición homogénea o heterogénea.

INTRODUCCIÓN

Esta técnica, también llamada de análisis de Ouchterlony, está basada en el principio de que el Ag y el Ac difunden a través de un medio semisólido (agarosa) formando complejos inmunes estables en la zona de equivalencia.

Las líneas de precipitación resultantes, que representan complejos Ag-Ac, son analizadas visualmente, con luz indirecta y con ayuda de una lupa. La técnica se utiliza para investigar una mezcla antigénica.

En el laboratorio, se pueden preparar las placas de agarosa para realizar la DD o bien utilizar placas comerciales (INOVA).

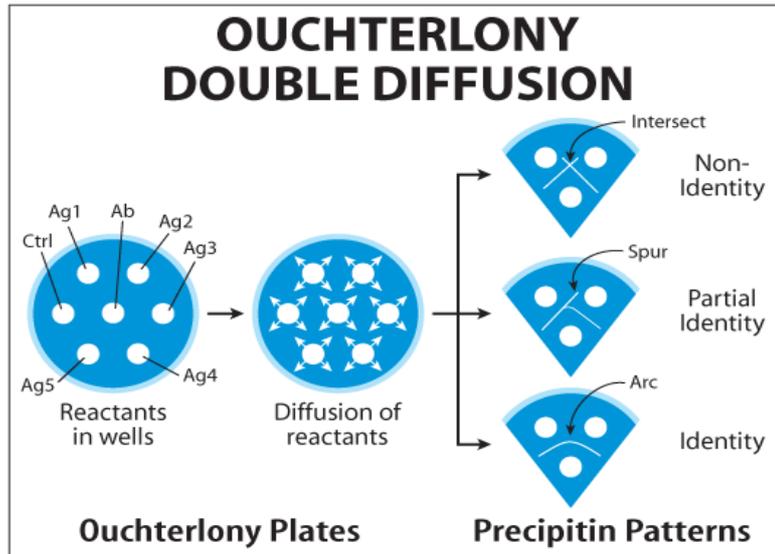
MATERIALES Y MÉTODO

- Agar purificado al 1.5% P/V, en solución de cloruro de sodio 0.15M y 0.01% de mertiolate o agarosa al 0.8%
- Sueros precipitantes.
- Soluciones de antígeno a estudiar.
- Placas de Petri o portaojetos.
- Pipetas de 1ml y 10ml.
- Pipetas Pasteur.
- Sacabocados o matrices especiales para la confección de los orificios sobre el gel de agar.

En caja de Petri estéril se depositarán 15 ml de agar fundido y enfriado a 50°C. Se dejará solidificar y se confeccionarán pares de orificios de 5mm de diámetro, que distarán 1 cm entre sí. Se colocarán 4 pares por placa, la ubicación de los mismos se distribuirá a conveniencia.

En los distintos orificios enfrentados se sembrarán 0.1 ml de Ag y 0.1 ml del suero a testear. Se detectarán las correspondientes bandas de precipitación en el espacio que separa los orificios. Las placas se mantendrán en cámaras húmedas.

Las lecturas de los resultados se efectuarán a las 24-72hs. Se pueden observar distintos patrones:



6. DIFUSIÓN RADIAL

OBJETIVO

- Determinar la concentración de componentes proteicos (C3, C4, IgA, IgG, IgM) en una muestra sérica e interpretar los valores obtenidos en el contexto de la patología del paciente.
- Realizar una curva de calibración utilizando como muestra patrón un pool de sueros humanos de concentración conocida, determinar los valores de concentración de muestras problema y comparar con los valores obtenidos a partir de la tabla de las placas comerciales.

INTRODUCCIÓN

Este método está basado en la reacción de precipitación entre un Ag y un Ac en un gel de agar. El Ac es incorporado en el agar antes que solidifique y el Ag difunde desde un reservorio circular que ha sido cortado en el agar. Con un antisuero (As) monoespecífico a concentración adecuada para el rango de concentraciones del antígeno, se formará luego de la interacción Ag-Ac, alrededor del reservorio del Ag cuyo diámetro es proporcional a la concentración del mismo.

En el laboratorio, se puede preparar las placas para IDR, tal como se detalla a continuación, o bien **utilizar placas comerciales (Biocientífica, BioRAD).**

MATERIALES Y MÉTODO

- Agar purificado para uso en inmunodifusión. Con él se prepara una solución al 2% en buffer veronal sódico pH 8,4 (el utilizado en IEF, adicionado con 0,01% de mertiolate) o en buffer borato pH 8,6 utilizado para electroforesis de proteínas que ya tiene incorporado el mertiolate.
- Antisueros específicos.
- Antígenos patrones comerciales o pool de sueros humanos normales de concentración conocida.
- Placas de vidrio de 3 x 10 cm o similares, también pueden utilizarse portaobjetos.
- Pipetas de 2 μ l, 1 ml y 5 ml.
- Sacabocados de 2 mm de diámetro o matrices especiales para la confección de los orificios sobre las placas de agar.

PROCEDIMIENTO

- a) Fundir el agar al 2% en un baño de agua a ebullición.
- b) Añadir 5-10% del antisuero específico al agar fundido y enfriado a 50 °C, procurando que la mezcla sea lo más homogénea posible.
- c) Homogeneizar la mezcla por inversión suave; cubrir inmediatamente la placa con una cantidad de la mezcla capaz de producir una capa de gel de 1 mm de espesor y dejar solidificar. Debe obtenerse una placa uniforme.
- d) Mediante el empleo del sacabocados efectuar sobre el gel una serie de orificios, los que deben estar a una distancia de 1cm aproximadamente, para evitar interferencias entre los halos de precipitación.
- e) Colocar en 3 reservorios de la placa, 5 μ l de diluciones apropiadas de la solución patrón (pura, $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$)
- f) En los reservorios restantes colocar 5 μ l de las muestras a ser evaluadas.
- g) Dejar difundir en cámara húmeda a temperatura ambiente hasta que el diámetro de los halos no varíe (48-72hs).
- h) Medir con regla milimetrada el diámetro de los halos, elevarla al cuadrado y graficar la curva colocando en las abscisas mg% del antígeno standard y en las

ordenadas el valor de los diámetros obtenidos. Determinar en base al diámetro obtenido con los sueros en estudio, la concentración del componente proteico.

Para la **determinación cuantitativa** del antígeno se realiza una curva con los valores experimentales la cual sigue la ecuación derivada de la Ley de Fick:

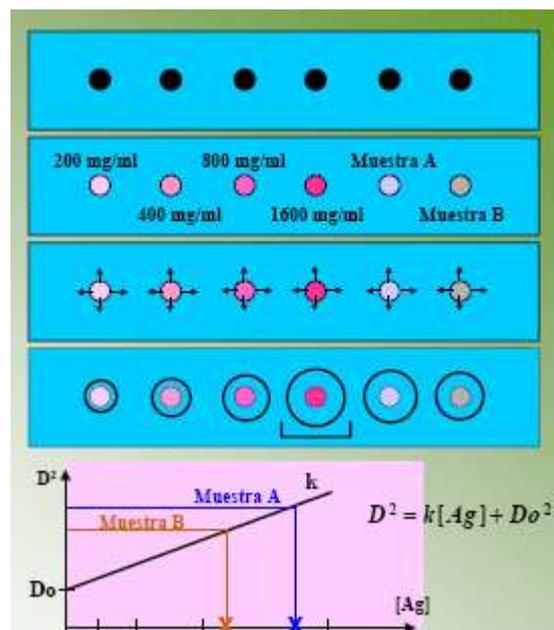
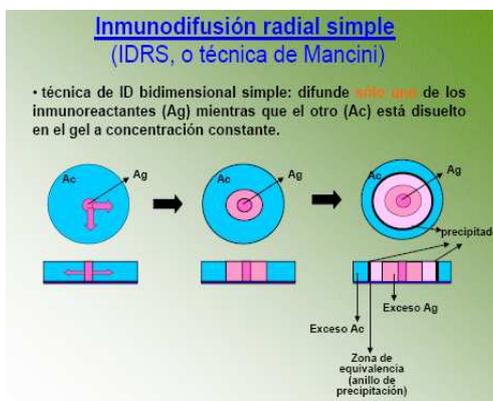
$$D^2 = D_0^2 + k [Ag]$$

D = diámetro del halo de precipitación obtenido experimentalmente. Ordenada de la curva

D_0 = representa el diámetro del reservorio. Es la ordenada al origen de la curva que se obtiene experimentalmente.

k = representa la pendiente de la curva obtenida.

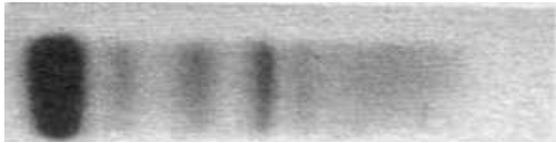
[Ag] = abscisa de la curva.



CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

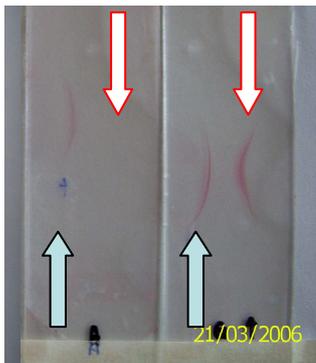
Mujer de 56 años de edad. Con antecedentes de dolores óseos, osteoporosis y cifosis marcada. Refiere al momento de la consulta sensación de debilidad, pérdida del apetito y de peso. Presenta anemia, hipercalcemia y las radiografías evidencian imagen osteolítica en saca bocado a nivel craneal.



Normal

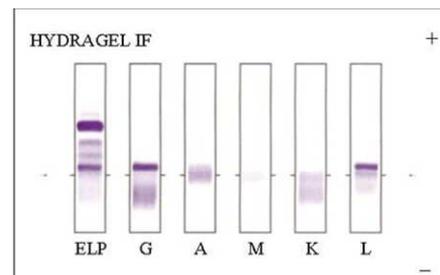


Paciente



IgA

IgG

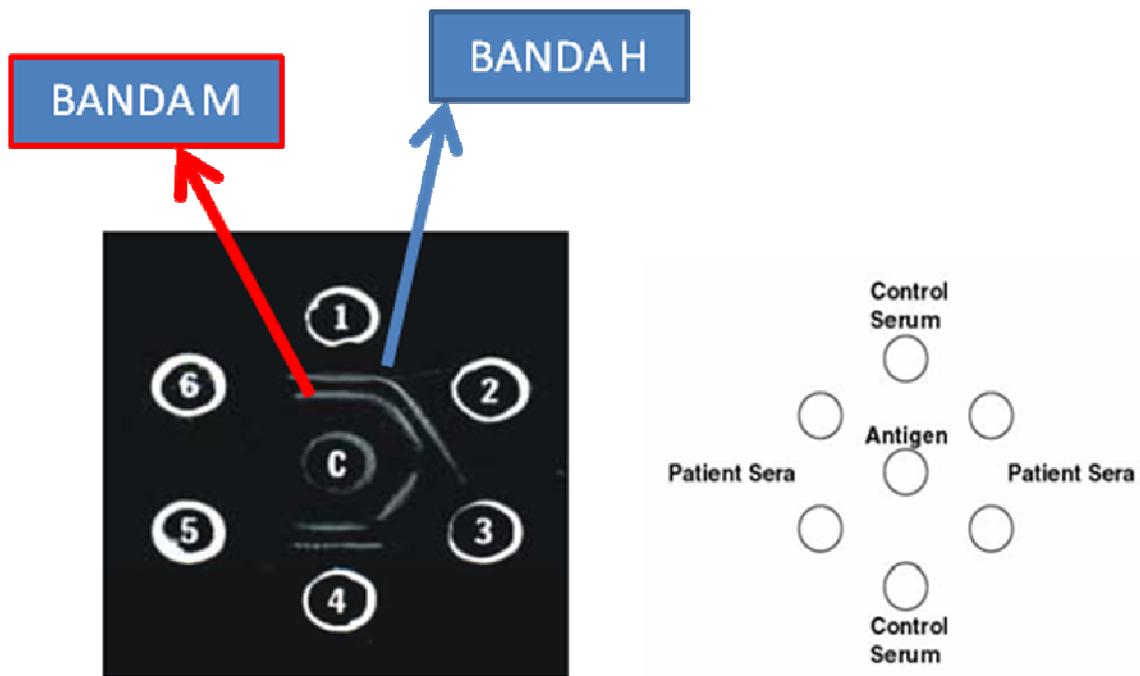


1. Indique e interprete las técnicas inmunológicas utilizadas en el estudio realizado al paciente.
2. ¿Cuál sería el diagnóstico presuntivo?
3. ¿Qué otro estudio podría realizar? ¿En qué consiste y por qué es necesario?

CASO CLÍNICO N° 2

Paciente masculino de 45 años que desempeña tareas rurales en el interior de chaco, consulta al médico por lesiones cutáneas eritematosas infiltrativas, nodulares, ulceradas y con costra hemática, en extremidades que le causan dificultad al trabajar.

El médico sospecha estar frente a un caso de Histoplasmosis. La bioquímica del hospital observó en la prueba de Ouchterlony (muestra sembrada en el pocillo 3) las siguientes bandas:



Banda M forma aguda o crónica, infección pasada o prueba cutánea reciente. Sola indica infección precoz. Aparece en el 70% de los casos.

Banda H forma activa y progresiva, no es influenciada por la histoplasmina, rara vez aparece sola.

Banda H y M juntas, aparecen sólo en el 10% de los pacientes

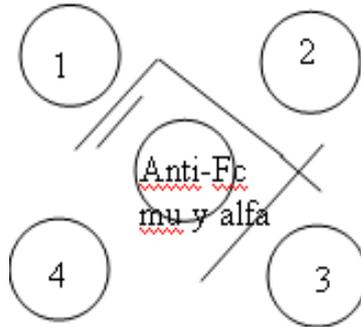
Ambas bandas tienen valor semiológico

1. Interprete el resultado obtenido en la placa tanto para el paciente en estudio (3) como las otras muestras sembradas en los pocillos 2, 3 y 6.
2. Mencione las ventajas de la técnica elegida.
3. ¿Qué otros estudios pediría para confirmar?
4. ¿Qué importancia tiene esta patología en pacientes inmunodeprimidos?

CASO CLÍNICO N° 3

En el laboratorio por precipitación con sulfato de amonio y purificación por columna de intercambio iónico los alumnos obtuvieron IgG humana. Para evaluar su pureza diseñaron el siguiente esquema en el que pusieron anti- Fc mu y anti-Fc alfa en el pocillo del centro, suero precipitado sin purificar en el pocillo 1. Se colocó en pocillo 2-3-4 los purificados obtenidos por las comisiones 1-2 y 3 respectivamente.

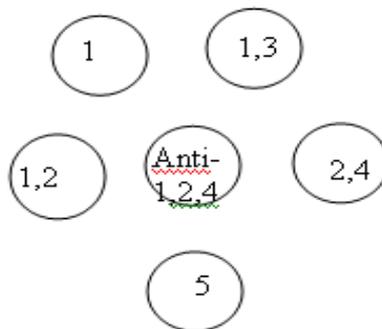
- a- ¿Qué comisión purificó la IgG?
- b- Con respecto a las comisiones que tienen contaminantes ¿cómo son esos contaminantes?



CASO CLÍNICO N° 4

Analice las opciones planteadas, resuelva y conteste V (verdadero) o F (falso):

- a- ¿Una banda de identidad me indica que las muestras son iguales?
- b- ¿Una banda de no identidad indica que las muestras son diferentes?
- c- ¿Puedo trabajar con un antígeno que tenga un único determinante antigénico?
- d- Como el antígeno tiene varios determinantes antigénicos diferentes ¿debo trabajar con anticuerpos poliespecíficos?



CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

- 1- Indique las diferencias y semejanzas de la precipitación en medio gelosado y en medio líquido.
- 2- ¿En qué consiste la técnica de Ouchterlony? Describa los materiales, reactivos y condiciones para realizar esta metodología.
- 3- Cuáles son los factores que influyen en la aparición de las bandas de precipitación?
¿Cuáles son las leyes de física que rigen la difusión de las macromoléculas?
- 4- ¿Qué tipos de bandas de precipitación pueden definirse en el Ouchterlony? Dé ejemplos de cada una de ellas.
- 5- ¿Cuál es la utilidad práctica de la técnica de Ouchterlony? ¿Es una técnica cuali o cuantitativa? ¿Sirve para resolver muestras simples y/o complejas?
- 6- Puede decirse que dos antígenos que presentan bandas de identidad son realmente idénticos? Por qué?
- 7- ¿En qué consiste la inmunodifusión radial? Fundamento de las técnicas de Fahey y Mancini. Mencionar las causas más frecuentes de error en cada metodología.
- 8- Concepto de monoespecificidad. ¿Cómo se obtienen los sueros monoespecíficos?
- 9- ¿Cuáles de las técnicas de precipitación en medio gelosado son cualitativas o cuáles cuantitativas?

INFORME

- Realizar un informe respondiendo el cuestionario guía.
- Utilizando un sistema de lectura apropiado, leer el diámetro de los halos de precipitación y determine la concentración de cada muestra problema a partir de la tabla provista por el fabricante de la placa de IDR.
- A partir de las corridas electroforéticas realizadas en suero / orina, analizar los patrones observados y su relación con patologías.
- Esquematizar las placas de agarosa (técnica de Ouchterlony) e interpretar los resultados obtenidos, consignando en cada caso, el sistema Ag-Ac utilizado y el patrón de precipitación.
- Interpretar los casos clínicos

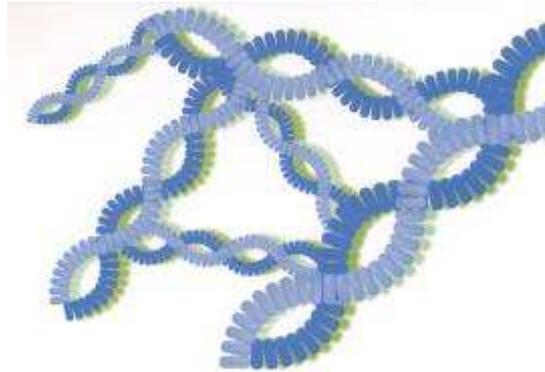
BIBLIOGRAFÍA

- Margni RA. Inmunología e Inmunología. Fundamentos. 5° Edición. Editorial Médica Panamericana. 1996. ISBN 8479033177.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5° Edición. Español. Editorial Harcourt. 2000. ISBN 8481744972.
- Roitt IM, Delves PJ. Inmunología. Fundamentos. 10° Edición. Editorial Médica Panamericana. 2003. ISBN 950061869-9 8479038144.
- Rose, Conway de Macario, Fahey, Friedman and Penn. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. 1992. American Society for Microbiology.
- Stites D P. Inmunología Básica y Clínica. 10° Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003. ISBN 9684269978.
- O'Connell TX, Horita TJ, Kasravi B. Understanding and interpreting serum protein electrophoresis. American Family Physician 2005; 71(1)105-112.
- Bossuyt X. Advances in serum protein electrophoresis. Adv Clin Chem. 2006; 42:43-80.
- Ivory CF. Several new electrofocusing techniques. Electrophoresis. 2007; 28(1-2):15-25.
- Dolník V. Capillary electrophoresis of proteins 2005-2007. Electrophoresis. 2008; 29(1):143-56.
- Huang YF, Huang CC, Hu CC, Chang HT. Capillary electrophoresis-based separation techniques for the analysis of proteins. Electrophoresis. 2006; 27(18):3503-22. Marshall T, Williams KM. Electrophoretic analysis of bence jones proteinuria. Electrophoresis. 1999; 20(7): 1307-24
- D'aguanno S, Del boccio P, Bernardini S, Ballone E, Di ilio C, Federici G, Urbani A. Electrophoretic separations of cerebrospinal fluid proteins in clinical investigations. Clin Chem Lab Med. 2007; 45(4): 437-49.
- Keren DF. Procedures for the evaluation of monoclonal immunoglobulins. Ach Pathol Lab Med. 1999; 123(2): 126-32.
- Hoffman-Snyder C, Smith Be. Neuromuscular disorders associated with paraproteinemia. Phys Med Rehabil Clin Am 2008; 19(1):61-79.
- Kyle RA, Rajkumar SV. Multiple myeloma. Blood. 2008; 111(6):2962-72.

- Vijay A, Gertz MA. Waldenström macroglobulinemia. *Blood*. 2007; 109(12): 5096-103.

TRABAJO PRÁCTICO N°6

TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN



OBJETIVOS

- Comprender los distintos tipos de técnicas de aglutinación disponibles en el laboratorio inmunológico.
- Conocer el fundamento de cada una de ellas.
- Informar e interpretar los resultados en el contexto de una situación clínica.

INTRODUCCIÓN

Técnicas de aglutinación: detección de anticuerpos utilizando **el antígeno en estado particulado**, aunque es importante destacar que también puede utilizarse en el laboratorio microbiológico para identificar microorganismos. Los principios que regulan esta reacción son los mismos que para la precipitación.

Directa: el antígeno es por sí mismo particulado, por lo que no requiere fijación a soportes inertes.

- Rápida, en placas
- Lenta, en tubos o microplacas

Indirecta o pasiva: antígenos solubles unidos a glóbulos rojos o partículas inertes como el poliestireno, la bentonita o el colodión. En ocasiones, pueden utilizarse bacterias como soporte (*Micrococcus lysodeikticus*).

- Rápida, en placas
- Lenta, en tubos o microplacas

En ambos casos, los ensayos pueden ser **cualitativos o semicuantitativos**. En algunos reactivos comerciales, a partir del **límite de detección** consignado en el inserto, es posible **informar cuantitativamente**.

Reacción de floculación

Esta metodología se caracteriza por no formar precipitados hasta que la cantidad de Ag añadido no exceda de ciertos límites, cosa que no ocurre con la precipitación. Aquí hay formación de agregados que sedimentan con el añadido de cantidades mínimas de Ag.

En la **floculación**, los complejos formados se agregan y sedimentan en un rango muy estrecho de la relación Ag/Ac; en la zona de exceso de Ag y exceso de Ac sólo se forman complejos solubles. En la precipitación esto es bien manifiesto en la zona de

exceso de Ag. Parecería que es una propiedad dependiente más de los anticuerpos que de los antígenos.

Los caballos inmunizados con proteínas como la toxina diftérica o tetánica, proporcionan sueros que dan floculación, sin embargo inmunizados con polisacáridos dan sueros precipitantes.

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN DIRECTA EN TUBOS CUANTIFICACIÓN DE ISOHEMAGLUTININAS

OBJETIVO

Determinar cuantitativamente las isohemaglutinas séricas.

INTRODUCCIÓN

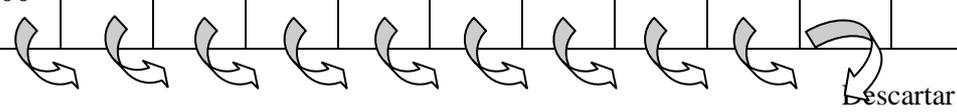
Las isohemaglutininas antiA y anti-B son anticuerpos naturales dirigidos contra los polisacáridos del glóbulo rojo. Están presentes normalmente en el primer año de vida y sus títulos son superiores a 1/8; su determinación tiene importancia en las **inmunodeficiencias de anticuerpos**.

Esta determinación también es importante en los casos de **transplante de MO**. Cuando existe incompatibilidad de grupo sanguíneo ABO entre el donante y el receptor, ésta puede ser de tipo mayor (cuando el receptor tiene isohemaglutininas dirigidas contra los antígenos ABO de superficie del donante), menor (cuando el donante tiene isohemaglutininas dirigidas contra los antígenos ABO del receptor) y mixta (cuando concommitan las dos anteriores).

Procedimiento:

- Extracción de sangre venosa al paciente en estudio, para obtener la **muestra de suero o plasma. Es importante que la muestra sea límpida, libre de hemólisis.**
- Tipificar **glóbulos rojos humanos** (A, B o AB). Lavar tres veces con solución fisiológica (SF) y resuspender al 3-5% en SF.
- Esquema de reacción:

Tubo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
SF (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Suero o plasma (μl)	100										-----



GR 3-5% (μl)	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100
Título	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32	1:64	1:128	1:256	1:512	1:1024	0

- Homogenizar y centrifugar 1' a 2000-3000 rpm.
- Agitar suavemente y observar la aglutinación.
- **Informar el título de isohemaglutininas de la muestra.**

PRUEBA DE COOMBS DIRECTA

OBJETIVO

Determinar la presencia de anticuerpos incompletos mediante el uso de un segundo anticuerpo, que es la antiglobulina o suero de Coombs.

INTRODUCCIÓN

Hay dos formas de realizar la prueba de Coombs: directa e indirecta.

La prueba de Coombs directa se utiliza para detectar la presencia de IgG y/o fracciones del complemento que se encuentran fijados *in vivo* a la superficie de los glóbulos rojos.

Una prueba de Coombs directa positiva significa que la persona tiene anticuerpos que actúan contra sus glóbulos rojos, lo cual puede deberse a:

- Anemia hemolítica autoinmunitaria sin otra causa subyacente
- Anemia hemolítica inducida por medicamentos (muchos medicamentos han sido asociados con esta complicación)
- Eritroblastosis fetal (enfermedad hemolítica del recién nacido)
- Mononucleosis infecciosa
- Infección por micoplasma
- Sífilis
- Leucemia linfocítica crónica u otro trastorno linfoproliferativo
- Lupus eritematoso sistémico u otra afección reumatológica
- Reacción dudosa en una transfusión sanguínea

Esta prueba también es anormal en algunas personas sin una causa clara, especialmente entre los ancianos. Hasta el 3% de las personas que están hospitalizadas sin un trastorno sanguíneo conocido tendrán un resultado anormal en la prueba de Coombs directa.

PROCEDIMIENTO

- Realizar la extracción de sangre venosa en condiciones asépticas, pudiendo utilizar como anticoagulante EDTA, heparina, ACD (ácido cítrico, citrato, dextrosa), CPD

(citrato, fosfato, dextrosa) o CPDA-1 (citrato, fosfato, dextrosa, adenina). También puede utilizarse sangre entera.

-Preparar una suspensión de glóbulos rojos del paciente en PBS al 3%

-En un tubo de hemólisis colocar 1 gota de la suspensión y lavar los glóbulos rojos 3 veces con PBS. Descartar completamente el sobrenadante después del último lavado.

-Agregar 2 gotas del suero de Coombs al botón de glóbulos rojos; mezclar perfectamente y centrifugar durante 15 segundos a 3.500 rpm. Se puede utilizar en este caso **Suero de Coombs Monoclonal-Poliespecífico (Anti-IgG,-C3d) o bien Anti-IgG Monoclonal Monoespecífico y Anti-C3d Monoclonal Monoespecífico.**

-Resuspender las células por agitación y observar macroscópicamente. Tener en cuenta que agitaciones demasiado vigorosas pueden desligar aglutinaciones débiles.

OTRAS TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN INDIRECTA

Durante el TP se llevarán a cabo distintas técnicas de aglutinación directa rápida, las que se desarrollan en placas de vidrio.

EL alumno deberá leer atentamente los insertos de los reactivos a utilizar (Wiener lab.), los que serán proporcionados por la asignatura o bien podrán ser bajados de la página que dicho laboratorio tiene en internet (www.wiener-lab.com.ar).

- **GRUPO SANGUÍNEO Y FACTOR RH,**
- **REACCIÓN DE HUDDLESON,**
- **VDRL.**

TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN INDIRECTA EN TUBOS

PRUEBA DE COOMBS INDIRECTA

OBJETIVO

Investigar la presencia de anticuerpos contra los glóbulos rojos humanos en el suero de una mujer embarazada Rh negativa.

INTRODUCCIÓN

La reacción se realiza en dos etapas. En la primera, glóbulos rojos 0⁺ lavados se incuban con el suero del paciente para sensibilizarlos y en una segunda etapa se incuban el complejo antígeno-anticuerpo con la antiglobulina de Coombs.

Una prueba de Coombs indirecta positiva significa que la persona tiene anticuerpos contra antígenos de los glóbulos rojos, lo cual puede sugerir la presencia de:

- Screening de suero de donantes y pacientes para anticuerpos
- Pruebas de compatibilidad sanguínea previa a la transfusión (cuando se utiliza en bancos de sangre)
- Fenotipo de glóbulos rojos
- Identificación y titulación de anticuerpos encontrados en suero o eluatos.

PROCEDIMIENTO

- Realizar la extracción de sangre venosa en condiciones asépticas, sin anticoagulante y dejar exudar el suero en baño a 37°C.
- En un tubo de hemólisis colocar 2 gotas del suero a probar
- Agregar 1 gota de suspensión de glóbulos rojos 0⁺ al 3-5% lavados y resuspendidos en PBS
- Mezclar e incubar a 37°C durante 30-60 minutos
- Lavar los glóbulos rojos 3 veces con PBS. Descartar completamente el sobrenadante después del último lavado.
- Agregar 2 gotas del suero de Coombs al botón de glóbulos rojos; mezclar perfectamente y centrifugar durante 15 segundos a 3.500 rpm. Se puede utilizar en este

caso **Suero de Coombs Monoclonal-Poliespecífico (Anti-IgG,-C3d) o bien Anti-IgG Monoclonal Monoespecífico y Anti-C3d Monoclonal Monoespecífico.**

-Resuspender las células por agitación y observar macroscópicamente. Tener en cuenta que agitaciones demasiado vigorosas pueden desligar aglutinaciones débiles.

OTRAS TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN INDIRECTA

Durante el TP se llevarán a cabo distintas técnicas de aglutinación indirecta.

Las mismas utilizan como soporte partículas de látex o gelatina o glóbulos rojos y se desarrollan en placas de vidrio o policubetas de poliestireno de fondo en U.

EL alumno deberá leer atentamente los insertos de los reactivos a utilizar (Wiener lab.), los que serán proporcionados por la asignatura o bien podrán ser bajados de la página que dicho laboratorio tiene en internet (www.wiener-lab.com.ar).

- **ARTRITEST,**
- **PCR,**
- **HEMAGLUTINACIÓN INDIRECTA PARA TOXOPLASMOSIS Y CHAGAS,**
- **AGLUTINACIÓN DE PARTÍCULAS DE GELATINA PARA HIV.**

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

Recién nacido pretérmino de bajo peso, producto de un embarazo no controlado.

Al examen físico de ingreso presentó hepatoesplenomegalia y retardo pondero estatural, hiperbilirrubinemia, anemia y plaquetopenia.

Se realizó serología materna: VDRL (NR), Toxoplasmosis (ELISA -), HbsAg (-), HIV (Elisa NR), Rubéola IgG (-), Chagas HAI 1/128 y Elisa IgG Chagas (+).

Al recién nacido se le realiza:

Hemocultivos: no se observa desarrollo después de 7 días de incubación.

Cultivo de LCR: no se observa desarrollo.

El médico solicita serología para chagas en el niño.

- a) ¿Está de acuerdo con el pedido de análisis? Justifique. Explique brevemente técnicas diagnósticas.
- b) Plantee un algoritmo diagnóstico.
- c) Tras haber recibido tratamiento, ¿puede tomar como criterio de curación parasitología negativa (búsqueda del T. cruzi)?

CASO CLÍNICO N° 2

Paciente de 14 años, sexo masculino, procedente de Montevideo, estudiante.

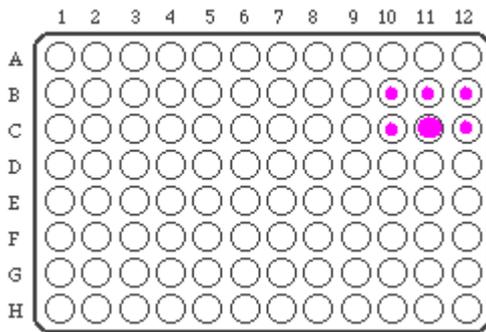
Buenas condiciones sanitarias. No había viajado al interior ni al exterior del país. No estuvo en contacto con personas enfermas. Tenía 2 gatos con los que jugaba.

Consultó por cuadro de 11 días de evolución caracterizado por fiebre de 40° C, escalofríos, habiendo tenido diarreas en 2 ocasiones y cefalea al comienzo. Negó vómitos, síntomas respiratorios, mialgias, erupciones cutáneas, astenia y repercusión general. Al examen físico presenta adenomegalias de 2 a 3 cm en regiones carotídeas, espinales y axilares las que eran elásticas, indoloras y libres. Esplenomegalia a 2 cm del reborde costal. Examen cardiovascular y pleuropulmonar normales. Fondo de ojo normal.

Laboratorio:

- * Funcional hepático: normal.
- * Glucemia: normal
- * Azoemia: normal
- * Orina: normal

- * Serología para citomegalovirus: IgG 1/256, IgM negativo.
- * Serología para toxoplasmosis: IgG (HAI) 1/8.096, IgM reactivo.
- * VIH:



control +: columna 11
control -: columna 10
muestra: columna 12

* VDRL: negativo.

- a) Interprete la aglutinación de partículas de gelatina para HIV.
- b) ¿Cuál es la enfermedad con la que cursa el paciente al momento de la consulta? (teniendo en cuenta serología para CMV y Toxoplasmosis)
- c) En la técnica de HAI, ¿qué reactivo me permite diferenciar exclusivamente la actividad aglutinante de IgG? ¿Cómo detecta Ac heterófilos?

CASO CLÍNICO N° 3

Joven de 23 años que en presencia de síntomas seudogripales y dolor de garganta, se automedica con amoxicilina.

Días después y sin haber suspendido la toma del fármaco, manifiesta dificultad para respirar, fatiga y nota que su piel está amarillenta y que su orina es oscura.

Decide entonces consultar con el médico quien ante el examen físico detecta esplenomegalia.

Laboratorio:

Hb: 6g%	Mujeres: 12.0 ± 2.0 g%
	Hombres: 14.0 ± 2.0 g %
Hto: 17%	Hombres: 47.0 ± 7.0 %
	Mujeres: 42.0 ± 5.0 %
Bilirrubina total: 5 mg/dl	Adultos: hasta 1,0mg/dl
Bilirrubina indirecta: 3,5 mg/dl	Adultos: hasta 0,9mg/dl
Hemoglobinuria: +++	

- a) ¿Cuál podría ser el diagnóstico presuntivo?
- b) ¿Qué otras pruebas de laboratorio sugeriría para confirmar sus sospechas? Mencione el fundamento de dichas pruebas y en que otras situaciones podrían ser útiles.
- c) ¿Cuál es el mecanismo por el cual el fármaco puede dar lugar a ésta patología?
- d) ¿Qué otros fármacos podrían causar éste tipo reacción?

CASO CLÍNICO N° 4

Niño de 4 años concurre al laboratorio para la determinación de su grupo ABO.

Por el método de aglutinación directa el niño resulta A+. Además se le realiza el método de aglutinación indirecto observándose ausencia de aglutinación.

- ¿Cuál es la razón de la discrepancia entre las pruebas?
- ¿Qué son los anticuerpos irregulares?
- ¿Cómo descarta la presencia de anticuerpos irregulares?
- Si piensa en una hipogammaglobulinemia, ¿qué prueba de aglutinación realizaría? Explique.

CASO CLÍNICO N° 5

Un varón de 37 años con vida previa activa refiere dolores osteoarticulares de localización variable en el último mes y fiebre en la última semana con picos (matutino y vespertino) de 40 C las últimas 24-48 horas, por lo que acude al Servicio de Urgencias. Refiere haber ingerido leche de cabra sin pasteurizar y queso.

Los datos analíticos muestran los siguientes resultados:

Hemograma: Hb 13,7 g/dl	Mujeres: 12.0 ± 2.0 g%
	Hombres: 14.0 ± 2.0 g %
Leucocitos 14.610/mm ³	5.000 a 10.000/mm ³
Plaquetas 206.000/ mm ³	150.000-400.000/mm ³
VSG: 40mm	5-15mm/hora

Bioquímica:

Glucosa 117 mg/dl	70-110 mg%
Urea 29 mg/dl	20-40 mg/dl
Creatinina 0,9 mg/dl	0,8- 1,4 mg/dl

Orina: sedimento normal.

- a) Teniendo en cuenta los síntomas del paciente y la anamnesis mencione cuál sería el diagnóstico presuntivo.
- b) ¿En qué consiste la reacción de Huddleson y cuál es su utilidad clínica? ¿Qué otras técnicas serológicas conoce para esta patología?
- c) ¿En qué etapa de la infección por Brucella es conveniente realizar pruebas de aglutinación directa? Explique.

CASO CLÍNICO N° 6

Mujer embarazada de 18 años de edad fue atendida en una clínica rural refiriendo los siguientes antecedentes personales: inicio de vida sexual a los 15 años, contando en su haber con múltiples parejas sexuales, y dando positivo a la prueba de VDRL.

El niño nace por parto vaginal, con bajo peso (1,370 g), lesiones mucocutáneas, hepatoesplenomegalia, linfadenopatía y rinitis.

Laboratorio:

VDRL: reactiva 32 dil

VDRL LCR: no reactiva

HIV: no reactivo

- a) Piense en el diagnóstico más probable y con qué pruebas de laboratorio confirmaría sus sospechas.
- b) En mujeres embarazadas, ¿en qué período de la gestación es conveniente realizar pruebas para detección de sífilis?
- c) ¿Reviste importancia que el parto ocurra por cesárea o por vía vaginal?
- d) ¿Cómo evalúa la eficacia del tratamiento?

INVESTIGUE

Aglutinación:

- Tipo de antígeno utilizado y soportes para fijar el antígeno.
- Métodos utilizados para fijar el Ag.
- Diferencias entre aglutinación directa e indirecta (pasiva), inhibición de la aglutinación.
- Reacción de Coombs: directa e indirecta, fundamentos. Utilidad clínica. Utilidad de los diferentes anticoagulantes en la obtención de la muestra de sangre.
- Utilidad clínica de las distintas técnicas.

Floculación:

- Tipo de Ag utilizado para muestras séricas y LCR.
- Definir prozona y postzona.
- Utilidad clínica.

INFORME

7. Realizar un informe de lo investigado.
8. Interpretar los casos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5° Edición. Editorial Médica Panamericana. 1996. ISBN 8479033177.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5° Edición. Español. Editorial Harcourt. 2000. ISBN 8481744972.
- Roitt IM, Delves PJ. Inmunología. Fundamentos. 10° Edición. Editorial Médica Panamericana. 2003. ISBN 950061869-9 8479038144.
- Rose, Conway de Macario, Fahey, Friedman and Penn. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. 1992. American Society for Microbiology.
- Stites D P. Inmunología Básica y Clínica. 10° Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003. ISBN 9684269978.
- Serra J, Velasco J, Godoy P, Mendoza J. ¿Puede sustituir la prueba de Brucellacapt a la prueba de Coombs en el diagnóstico de la brucelosis humana? *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2001; 19: 202-205.
- Zarandona JM; Yazer MH. The role of the Coombs test in evaluating hemolysis in adults. *CMAJ*, 2006; 174 (3). 305-307.
- www.scribd.com/doc/2450367
- www.scielo.cl/pdf/rcp/v50n2/art03.pdf
- www.cmaj.ca/cgi/content/full/174/3/305

TRABAJO PRÁCTICO N° 7

ENZIMOINMUNOANÁLISIS



OBJETIVOS

- Conocer los diferentes dispositivos empleados en ELISA.
- Definir las fases de un ensayo ELISA.
- Conocer los tipos de ensayo ELISA.
- Conocer los marcadores enzimáticos más comúnmente utilizados
- Conocer la utilidad de la metodología en otras especialidades: Microbiología, Hematología, Endocrinología.
- Interpretar los resultados obtenidos en el contexto de cada situación clínica.
- Desarrollar habilidades y destrezas en la realización de técnicas de ELISA

INTRODUCCIÓN

Los enzimoimmunoanálisis (EIA) o ELISA (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay) se basan en dos fenómenos biológicos importantes:

1. la elevada especificidad de los anticuerpos (Ac);
2. la alta actividad de algunas enzimas usadas en este tipo de ensayos, lo que permite la amplificación de la señal generada por la muestra.

Independientemente de los esquemas experimentales empleados, los EIA comprenden dos etapas generales:

1. la reacción de un inmunorreactante con un antígeno (Ag) o anticuerpo(Ac)
2. la detección de ese inmunorreactante mediante la utilización de un conjugado enzimático.

La sencillez de los ELISA, sumada a la potencialidad de los anticuerpos monoclonales, hace que día a día se vayan imponiendo sobre métodos tales como aquellos basados en la utilización de un trazador radiactivo (RIA). La gran ventaja del ELISA sobre los otros métodos reside en que no requiere un equipamiento demasiado sofisticado para su implementación en el laboratorio. Además los reactivos utilizados son de una vida media muy alta por lo que pueden conservarse en buen estado durante años y no se corre el riesgo de contaminación producida por el manipuleo de isótopos radiactivos.

Los EIA pueden clasificarse en HOMOGÉNEOS Y HETEROGÉNEOS. Los primeros se realizan exclusivamente en fase líquida, mientras que en los segundos se emplea un soporte sólido para inmovilizar a uno de los inmunorreactantes.

En la práctica diaria, son más utilizados los EIA heterogéneos, los que pueden clasificarse en dos tipos:

1. EIA de amplificación de la actividad o no competitivos,
2. EIA de modulación de la actividad o competitivos.

En todos los ensayos EIA en fase sólida, independiente de las numerosas estrategias existentes, se pueden distinguir 3 etapas:

1. inmovilización del inmunorreactante (Ac o Ag) en la fase sólida;
2. incubación con la muestra de modo que ésta reaccione con el inmunorreactante inmovilizado;
3. amplificación o modulación por medio de la utilización de un conjugado enzimático.

Resumiendo, los ensayos de ELISA permiten la detección de anticuerpos específicos, antígenos solubles o antígenos de superficie celular. En todos los casos los reactantes solubles se unen específicamente al reactante en fase sólida.

PROTOSCOLOS DE ELISA

Protocolos	Usos	Reactivos	Comentarios
Indirecto	Detección de Ac	Ag puro o semipuro, solución problema que contenga anticuerpo, conjugado enzimático que una Igs	Requiere grandes cantidades de Ag
Directo competitivo	Detección de Ag soluble	Ag marcado, solución problema conteniendo Ag. Compiten por Ac específico, ↑ color ↓ conc. de Ag en muestra	Ensayo rápido, excelente para mediar reactividad antigénica cruzada
Ac-sandwich	Detección de Ag soluble	Ac de captura, solución problema que contenga el Ag, Ac específico para el Ag conjugado a la enzima	Ensayo más sensible para detección de Ag, requiere cantidades relativamente grandes de Ac

			específico puro o semipuro
Doble sandwich-Ac	Detección de Ac	Ac de captura (específico para Ig de la especie inmunizada), solución problema que contenga el Ag, Ac conjugado a enzima específica para el Ag	No requiere Ag puro, ensayo relativamente largo
Celular Directo	Medición de Ags que se expresan en las membranas celulares	Células que expresan el Ag de interés, Ac específico para el Ag celular conjugado a la enzima	Ensayo sensible para una primera selección, poco sensible en poblaciones celulares heterogéneas
Celular Indirecto	Detección de Ac anti Ags celulares	Células usadas para inmunización, solución problema que contenga Acs, conjugado enzimático que una Ig de la especie inmunizada	Puede no detectar Acs específicos para Ags celulares que se expresan a baja densidad

A desarrollar durante el Trabajo Práctico

1. Detección de anticuerpos IgG anti *Toxoplasma gondii*. Dot Blot - Immunocomb.
2. Detección de anticuerpos anti VIH. ELISA 4º generación.
3. Detección de antígeno de superficie. Wiener lab.
4. Detección de gonadotropina coriónica humana. Inmunocromatografía.

En todos los casos, el alumno deberá leer atentamente el inserto de cada uno de los reactivos a utilizar en el trabajo práctico.

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

1) Mujer de 37 años de edad, previamente sana, consulta a su médico por presentar acolia y coluria. Ha tenido síntomas similares a los de la gripe durante la última semana, incluyendo fiebre, dolor de cabeza, disminución del apetito y náuseas leves. Niega uso de cualquier tipo de drogas intravenosas, haber recibido transfusiones de sangre, o haber hecho viajes en los últimos meses. Es una estudiante de posgrado en abogacía, está casada y tiene un hijo de 4 años y una hija de 9 meses que van a una guardería. El examen físico revela una temperatura de 39 °C, hepatomegalia leve e ictericia escleral. Estudios de laboratorio muestran un recuento de glóbulos blancos de 10.200/mm³, hematocrito de 38%, plaquetas 205.000/mm³, aspartato aminotransferasa (AST) de 842 U/L (VR: 10-40 U/L), alanina aminotransferasa (ALT) de 1.012 U/L (VR: 10-40 U/L) y bilirrubina total de 3,7 mg/dL (VR: 0,3-1,9 mg/dL). Se llevan a cabo otras pruebas de laboratorio, siendo diagnosticada con infección aguda por el VHA.

¿Cuál de las siguientes afirmaciones es correcta en relación con la infección aguda por VHA en esta paciente?

- A.** Debido a que la serología de anticuerpos para VHA puede ser negativa a principios de esta enfermedad, una prueba de PCR del suero o de las heces de la paciente, confirmaría mejor un diagnóstico de infección aguda por VHA.
- B.** Sus hijos son una fuente muy poco probable de exposición al virus, ya que no han mostrado ningún signo de ictericia.
- C.** Es probable que su exposición al VHA se produjo en los últimos 30-50 días.
- D.** El grado de elevación en sus niveles de aminotransferasas hepáticas sugiere que está en riesgo de infección crónica por VHA.

CASO CLÍNICO N° 2

Una joven de 22 años de edad, se presenta a una clínica. Su madre fue diagnosticada de hepatitis B crónica, por lo que la paciente le pidió a su médico para hacerse análisis

sobre VHB. Los resultados de sus pruebas de hepatitis B y los niveles de aminotransferasas hepáticas fueron los siguientes:

HBsAg: positivo

Ac anti-HBc total: positivo

IgM anti-HBc: negativa

Ac anti-HBs: negativo

HBeAg: positivo

Ac anti-HBe: negativo

ADN del VHB: $1,5 \times 10^7$ copias/mL

ALT: 25 U/L (VR: 10-40 U/L)

AST: 18 U/L (VR: 10-40 U/L)

El médico decide repetir los niveles de aminotransferasas en 3 meses. En ese momento, tanto ALT y AST se encuentran dentro del rango normal.

¿Cuál de las siguientes afirmaciones describe en qué fase de la infección por hepatitis B se encuentra la paciente y qué debe hacerse?

- A.** La paciente tiene infección aguda por VHB y debe ser seguida de cerca para ver si desarrolla una infección crónica.
- B.** La paciente se encuentra en la fase de tolerancia inmune y debe ser seguida de forma regular con los niveles de ALT cada 3-6 meses (y con mayor frecuencia si comienzan a elevarse).
- C.** La paciente tiene evidencia de inflamación hepática y se encuentra en la fase inmune activa de hepatitis crónica viral; debe iniciar inmediatamente el tratamiento para el VHB.
- D.** La paciente se encuentra en la fase de portador crónico inactivo de la hepatitis B y puede ser evaluada de nuevo, si desarrolla un aumento de los niveles de transaminasas hepáticas (ALT y AST).

CASO CLÍNICO N° 3

Mujer de 27 años de edad se presenta a una clínica con náuseas e ictericia. Durante los 3 últimos años, ha experimentado grandes problemas con la adicción a drogas

(metanfetamina). Casi siempre utiliza agujas estériles, pero 6 semanas atrás compartió agujas con un hombre a quien más tarde se le descubrió infección por VHB. Nunca ha recibido la vacuna contra el VHB. Hace dos años, se le practicó serología para hepatitis A, B y C, resultando todo negativo, pero no regresó para seguimiento y vacunación. Su examen físico es normal a excepción de las marcas en sus brazos y visible ictericia. Estudios de laboratorio muestran una bilirrubina total de 6,8 mg/dL, aspartato aminotransferasa (AST) de 1.906 U/L (VR: 10-40 U/L), y una alanina aminotransferasa (ALT) de 2.086 U/L (VR: 10-40 U/L). Pruebas serológicas para las hepatitis A, B y C han sido ordenadas por su médico.

¿Cuál de los siguientes perfiles serológicos sería más coherente con la infección por VHB aguda?

- A.** HBsAg (-), anti-HBs (+), anti-HBc total (+), HBeAg (-), anti-HBe (+).
- B.** HBsAg (+), anti-HBs (-), anti-HBc total (-), HBeAg (-), anti-HBe (+).
- C.** HBsAg (+), anti-HBs (-), anti-HBc total (+), HBeAg (+), anti-HBe (-).
- D.** HBsAg (-), anti-HBs (+), anti-HBc total (-), HBeAg (-), anti-HBe (-).

CASO CLÍNICO N°4

Joven de 19 años de edad se presenta a la clínica para seguimiento después de haber sido visto en el servicio de urgencias 2 noches antes por una sobredosis de estupefacientes. Su historial médico revela que empezó a usar heroína por vía intravenosa hace 2 meses y ha compartido agujas con varios conocidos. Es delgado, con leve ictericia escleral. Una revisión de estudios de laboratorio a partir de su visita a la sala de emergencias revela hemograma normal, alanina aminotransferasa (ALT) de 380 U/L (VR: 10-40 U/L), y una bilirrubina total de 4 mg/dL (VR: 0,3-1,9 mg/dL). Niega el consumo de alcohol o alguna historia de enfermedad hepática. Hace varios años, completó las dosis de vacuna contra la hepatitis B. Habida cuenta de su reciente exposición, infección aguda por VHC es muy sospechosa.

¿Cuál de las respuestas a continuación es verdadera con respecto a este paciente, y sobre diagnóstico y tratamiento de la hepatitis C aguda?

- A.** Menos del 40% de los pacientes con hepatitis C aguda tendrán síntomas asociados con infección aguda.
- B.** La respuesta inmune celular juega un papel menor en el clearance de los virus de la hepatitis C durante una infección aguda.
- C.** Si este paciente tiene hepatitis C aguda, sus posibilidades de eliminar la infección sin tratamiento son inferiores al 5%.
- D.** Si se inicia la terapia para hepatitis C aguda, la mayoría de los especialistas recomienda utilizar una combinación de interferón pegilado y ribavirina durante 1 año.

CASO CLÍNICO N°5

Hombre de 27 años, previamente sano, se presenta a un centro de atención de urgencias con fiebre, dolor de garganta, inflamación de ganglios linfáticos, fatiga, y una erupción. Sus síntomas han estado presentes durante aproximadamente 48 horas y su historia revela haber tenido relaciones sexuales sin protección con su pareja 12 días antes de la aparición de sus síntomas. Se realizó una prueba de anticuerpos contra VIH aproximadamente 6 meses atrás, que resultó negativa. Al examen físico muestra una temperatura de 39°C, faringitis no exudativa, linfadenopatía cervical y axilar, y una erupción generalizada morbilliforme. Todas las pruebas de laboratorio están pendientes. El diagnóstico de infección aguda (primaria) por VIH se sospecha.

¿Cuál de las siguientes afirmaciones es cierta en relación con la infección aguda por VIH?

- A.** Menos del 5% de las personas que adquieren el VIH desarrollan una enfermedad de presentación clínica aguda.
- B.** Más del 80% de los pacientes con infección aguda por VIH se presentan con meningitis aséptica.
- C.** Los pacientes recientemente infectados con el VIH suelen tener niveles plasmáticos de ARN del VIH superior a 50.000 copias/mL a las 4 semanas de contraer el VIH.
- D.** Un nivel de ARN del VIH de 2.400 copias/mL en combinación con una prueba de anticuerpos contra el VIH negativa sería diagnóstico de infección aguda por VIH.

CASO CLÍNICO N°6

Mujer de 31 años infectada por el VIH ha sido recientemente diagnosticada y viene a la clínica para su primera evaluación. Cree que fue probablemente infectada con el VIH aproximadamente 4 años atrás. Tres semanas antes de esta visita, su Papanicolaou mostró grave displasia cervical, lo que llevó a la prueba de anticuerpos contra el VIH. Su examen físico muestra candidiasis oral y leucoplasia vellosa oral. No tiene otro tipo de manifestaciones relacionadas con el VIH ni tampoco historia de complicaciones relacionadas con el VIH. Su recuento de CD4 es de 238 células/mm³ (12%) y el ARN del VIH es de 187.000 copias/mL.

Según la definición de caso del CDC del 2008 para la infección por VIH entre los adolescentes y adultos, *¿cuál de las siguientes afirmaciones es verdadera sobre la clasificación de la infección por el VIH de la paciente?*

- A.** El diagnóstico de la displasia cervical severa reúne los criterios para infección por el VIH, fase 4 (SIDA, supresión inmune severa).
- B.** El valor de ARN del VIH de 187.000 copias/mL reúne los criterios para infección por el VIH, fase 2 (SIDA).
- C.** El diagnóstico de la candidiasis oral cumple los criterios para infección por VIH, fase 3 (SIDA).
- D.** El porcentaje de CD4 del 12% reúne los criterios para infección por el VIH, fase 3 (SIDA).

INVESTIGUE

- ¿Cómo define SENSIBILIDAD Y LÍMITE DE DETECCIÓN de un ensayo?
- ¿Qué diferencia existe entre ensayos EIA homogéneos y heterogéneos?
- Existen sistemas alternativos de reconocimiento: sistema (strepta) avidina-biotina y Proteína A. ¿Qué características tiene cada uno de ellos?
- ¿Qué enzimas pueden usarse para la preparación de los conjugados?
- ¿Qué requisitos deben reunir las enzimas para ser utilizadas en ensayos ELISA?
- ¿Qué condiciones deben reunir los sustratos o compuestos cromogénicos para ser utilizados en ensayos ELISA?
- ¿Cuáles son las características de un buen conjugado enzimático? ¿Cómo se preparan los conjugados enzimáticos?
- ¿Qué características presentan los ELISA competitivos y no competitivos?
- Las aplicaciones del ELISA para el diagnóstico clínico.
- El inserto de los reactivos que se utilizan en el práctico, realizando un esquema de las etapas a seguir durante el desarrollo de la técnica. Asimismo, lea atentamente todo el instructivo con el objeto de interpretar el ensayo.

INFORME

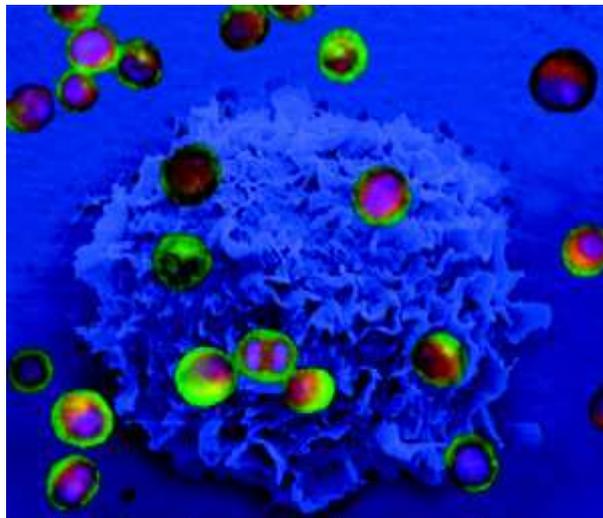
- Realizar un informe grupal a partir de lo investigado.
- Interpretarlos casos clínicos

BIBLIOGRAFÍA

- Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5º Edición. Editorial Médica Panamericana. 1996. ISBN 8479033177.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5º Edición. Español. Editorial Harcourt. 2000. ISBN 8481744972.
- Roitt I M, Delves PJ. Inmunología. Fundamentos. 11º Edición. Editorial Médica Panamericana. 2008. ISBN 978-950-06-0899-2.
- Rose, Conway de Macario, Fahey, Friedman and Penn. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. 1992. American Society for Microbiology.
- Stites D P. Inmunología Básica y Clínica. 10º Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003. ISBN 9684269978.
- López-Bernaldo de Quirós JC, Delgado R, García F, Eiros JM, Ortiz de Lejarazu R. Diagnóstico microbiológico de la infección por el VIH. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2007; 25(10): 632-638.
- ¿Qué significa recombinante? www.fertilityspain.com
- López-Hoyos M, Fernández Fresnedo G, López-Escribano H, de Francisco ALM. Antigenicidad de las proteínas recombinantes. *Gac Med Bilbao* 2003; 100: 17-21.
- Hernández-Marín M, Almenares-Guash P, Martínez-Ortiz Cs, Gómez-Cordero I, Melchor-Rodríguez A. Péptidos sintéticos del *Trypanosoma cruzi* para el inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Bioquímica* 2003. 28(1): 1-7.
- Delahanty-Fernández A, Valdivia-Alvarez I, Trujillo-Brito J, Hernández-Marín M, Gómez-Cordero I, Ventura-Paz J, Palenzuela-Díaz AI, Acosta-Bas C, Zulueta-Rodríguez O, Rodríguez AM. Respuesta de anticuerpos IgM contra epítomos inmunogénicos del virus de la hepatitis A. *Rev Biomed* 2004; 15: 11-16.

TRABAJO PRÁCTICO N°8

INMUNOFLUORESCENCIA



OBJETIVOS

- Conocer los diferentes dispositivos empleados en Inmunofluorescencia.
- Conocer las fases de un ensayo de IF.
- Conocer los tipos de ensayo de IF.
- Conocer la utilidad de la metodología en la práctica clínica.
- Interpretar los resultados obtenidos y su relación con distintas patologías.
- Desarrollar habilidades y destrezas en la realización de técnicas de IFI.

INTRODUCCIÓN

Metodologías aplicadas al estudio de las células del sistema inmune

En el organismo existen diversos sistemas encargados de mantener la homeostasis, entre los cuales podemos citar al Sistema Inmune (SI). El mismo, está compuesto por diversos y complejos mecanismos que actúan en forma simultánea y dinámica.

En términos generales podríamos decir que existen componentes humorales y celulares del SI, siendo estos últimos quienes tienen mayor participación en la respuesta inmune. Se refiere específicamente a las células mononucleares, como los linfocitos, monocitos, macrófagos y células dendríticas así como a los polimorfonucleares, neutrófilos, eosinófilos y basófilos.

Para el estudio experimental se pueden obtener células de distintos **órganos y fluidos**, utilizando distintos procedimientos:

- **Sangre periférica o médula ósea:** obtenida con EDTA o Heparina, donde encontramos células mononucleares y polimorfonucleares.
- **Timo:** donde encontramos en mayor proporción linfocitos en distintos estadios de maduración, células epiteliales, macrófagos y células dendríticas.
- **Bazo:** donde encontramos en gran medida glóbulos rojos y en menor proporción leucocitos.
- **Ganglio linfático:** donde predominan los linfocitos y en menor medida células presentadoras como macrófagos y células dendríticas.
- **Cavidad peritoneal:** donde encontramos un elevado porcentaje de macrófagos y en menor medida linfocitos y células dendríticas.

Aislamiento celular

Existen distintos métodos que permiten separar poblaciones celulares:

- **Gradiente de Ficoll-Triyosom, Percoll, Histoypaque:** permite separar células mononucleares viables de cualquier suspensión celular.
- **Lisis osmótica** con buffer hipotónico: permite eliminar los glóbulos rojos de cualquier suspensión celular; se obtienen de este modo leucocitos totales, con la desventaja de que el tratamiento puede afectar la viabilidad de las células.
- **FACS (Fluorescente-Activated Cell Sorter) o clasificadores de células activadas por fluorescencia.:** las células que emiten señales fluorescentes predeterminadas pueden ser desviadas diferencialmente por campos electromagnéticos cuya intensidad y dirección varía de acuerdo a la intensidad de la señal de la fluorescencia medida. De esta forma se pueden aislar poblaciones celulares en base al anticuerpo que conjugado a un fluorocromo se encuentra unido a la superficie celular, obteniéndose las células separadas en tubos colectores.

Ensayo de viabilidad

Utilizando azul de Tripán, se puede diferenciar entre células vivas y muertas. Las células vivas tienen la propiedad de excluir el colorante mediante un mecanismo activo. Una vez que las células mueren no pueden excluir el colorante y por lo tanto se observan al microscopio como células teñidas de azul.

Caracterización funcional

Ensayos in vivo: Pruebas cutáneas: la reacción de hipersensibilidad tipo retardada (DTH) es una técnica muy utilizada para evaluar la respuesta inmune mediada por células en pacientes y animales de experimentación.

Ensayos in vitro: los estudios funcionales in vitro de células del sistema inmune se llevan a cabo mediante distintas técnicas de cultivo celular: estudios de diferenciación, ensayos de proliferación, estudios de citotoxicidad, etc.

Caracterización morfológica y fenotípica

Microscopia de contraste de fase: es útil para el seguimiento de la morfología celular durante los cultivos celulares.

Microscopia electrónica: permite evaluar detalles de la ultraestructura celular y de la superficie celular (microscopía electrónica de transmisión y barrido)

Coloración de Giemsa: útil para la observación morfológica en extendidos (improntas) de células realizados a partir de suspensiones celulares.

Técnicas de Inmunomarcación celular: inmunocitoquímica, inmunohistoquímica, Inmunofluorescencia

Estas técnicas permiten detectar la presencia de antígenos en células en suspensión, células fijas a un soporte (improntas) o en cortes de tejidos. También se pueden utilizar para detectar anticuerpos en muestras séricas.

Estas técnicas combinan la sensibilidad de la unión antígeno-anticuerpo con la posibilidad de visualizar dicha reacción con un microscopio.

Existen diferentes métodos:

- **Directo:** utiliza un anticuerpo marcado dirigido hacia el antígeno de interés.
- **Indirecto:** utilizan un anticuerpo primario sin marcación seguido por un anticuerpo secundario o terciario marcado. En todos los casos, esta última etapa sirve para localizar el antígeno o el anticuerpo en el tejido o célula. Distintos marcadores pueden ser conjugados a los anticuerpos: fluorocromos, enzimas, oro coloidal, sustancias radiactivas.

INMUNOCITOQUÍMICA E INMUNOHISTOQUÍMICA

Estas técnicas son utilizadas para localizar anticuerpos o antígenos fijos a células o tejidos. Para ello, como primer paso, las células deben unirse a soportes sólidos para permitir un mejor manejo en los procedimientos posteriores. Esta unión puede realizarse por diversos métodos: las células en suspensión pueden ser centrifugadas, extendidas o ligadas químicamente sobre portaobjetos. En el caso de tejidos, deben ser fijados con paraformaldehído o alcoholes o congelados para su preservación y luego se

realizan cortes del mismo, los cuales se adhieren a un portaobjeto para poder realizar la reacción inmunoquímica.

Estas técnicas se utilizan en forma corrientes tanto para el diagnóstico como para investigación, ya que nos puede dar información sobre la presencia y localización de un determinado antígeno o de varios antígenos por técnicas de doble o triple marcación, como así también permite detectar la presencia de anticuerpos solubles que se unen a los antígenos fijados.

INMUNOFLUORESCENCIA

Dentro de los sistemas de visualización para las técnicas de inmunomarcación, uno de los más utilizados es la fluorescencia; la detección puede realizarse visualmente con el microscopio de fluorescencia o mediante un detector electrónico en la Citometría de flujo.

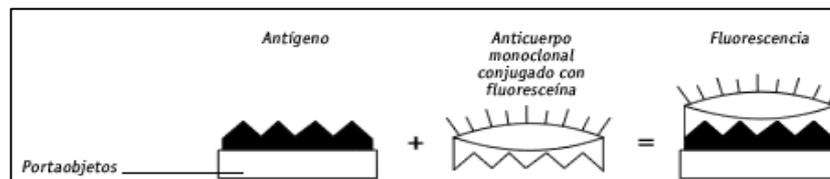
Ensayos de Inmunofluorescencia (IF)

- Los **ensayos de fluorescencia para la detección de antígenos**, como por ejemplo antígenos de *Chlamydia trachomatis*, utilizan el método de tinción directo. El procedimiento se realiza en un paso básico de reacción. La muestra clínica que presuntamente contiene antígenos del microorganismo bajo estudio es puesta en contacto con un anticuerpo monoclonal dirigido contra dicho microorganismo conjugado con fluoresceína. Si el antígeno esperado está presente se formará un complejo antígeno-anticuerpo. La reacción positiva en forma de fluorescencia verde manzana puede verse con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

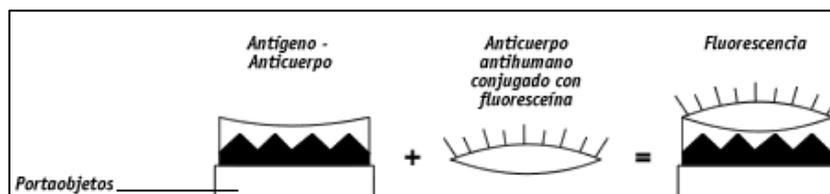
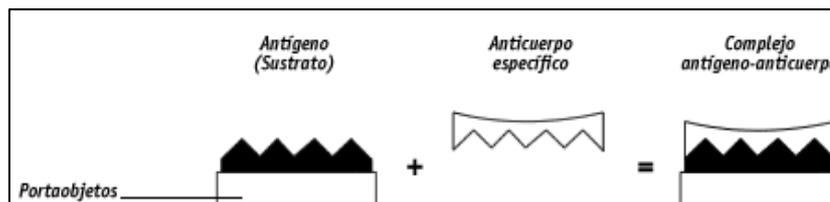
- Los **ensayos de fluorescencia para la detección de anticuerpos** utilizan el método de tinción indirecto descrito por primera vez por Weller y Coons en 1954. El procedimiento se realiza en dos pasos básicos de reacción. En el primer paso, el suero humano a ensayar es puesto en contacto con el sustrato antigénico. Si el anticuerpo está presente en el suero se unirá al antígeno, formando un complejo antígeno-anticuerpo. Si el suero no contiene anticuerpos dirigidos contra ese antígeno en particular, no se forma ningún complejo y todos los componentes del suero son eliminados en el paso de lavado. El segundo paso consiste en la adición de

un anticuerpo anti humano conjugado con fluoresceína a las áreas de reacción. Si en el primer paso se formó el complejo específico antígeno-anticuerpo, en el segundo paso el anticuerpo conjugado con fluoresceína se unirá al complejo. La reacción positiva en forma de fluorescencia verde manzana puede verse con la ayuda de un microscopio de fluorescencia.

Esquema de la Técnica de Inmunofluorescencia Directa (IFD)



Esquema de la Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI)



Técnica IFD:

1. Preparar la impronta con la muestra obtenida del paciente. También es útil para detectar la presencia de antígenos en células en suspensión o en cortes de tejidos.
2. Preparar la dilución del conjugado fluoresceinado específico y cubrir cada área reactiva con él.
3. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente.
4. Enjuagar los portaobjetos con buffer fosfato salino.

5. Colocar medio de montaje y cubrir con cubreobjetos. Leer los portaobjetos inmediatamente en un microscopio de fluorescencia.

Técnica IFI:

6. Cubrir las áreas con la dilución de screening de las muestras. Para determinaciones cuantitativas, preparar diluciones seriadas.

7. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente.

8. Enjuagar los portaobjetos con buffer fosfato salino.

9. Preparar la dilución del conjugado fluoresceinado y cubrir cada área reactiva con él

10. Incubar las muestras en cámara húmeda a temperatura ambiente.

11. Enjuagar los portaobjetos con buffer fosfato salino.

12. Colocar medio de montaje y cubrir con cubreobjetos. Leer los portaobjetos inmediatamente en un microscopio de fluorescencia.

DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-CÁNDIDA POR TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA

OBJETIVO

Detectar la presencia de anticuerpos IgG anti *Cándida albicans* por una técnica de Inmunofluorescencia.

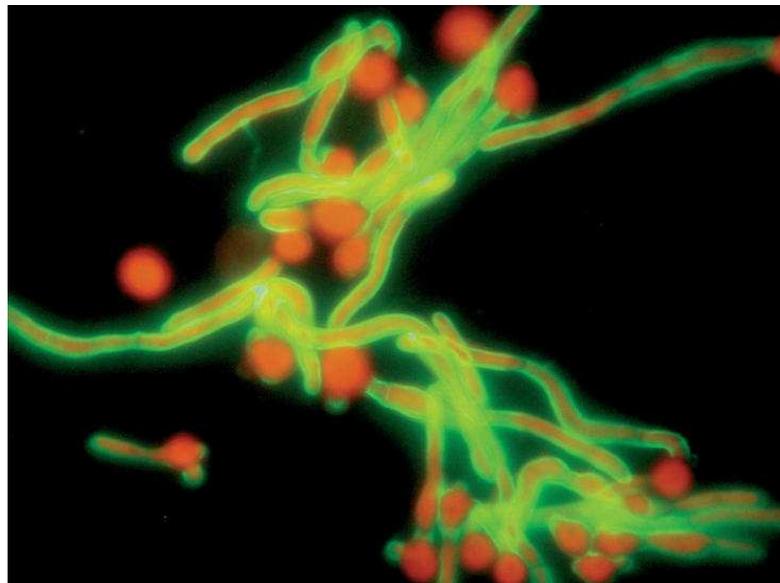
MATERIALES Y MÉTODO

- *Cándida albicans*
- Buffer PBS
- CFDA
- Suero anti-*Cándida*, obtenido a partir de la inmunización de conejo con *C albicans* formoladas.
- Complemento de conejo.
- Bromuro de etidio-EDTA.
- Glicerina tamponada.
- Centrífuga
- Vortex
- Microscopio de fluorescencia

La *Cándida* se siembra en medio Sabouraud en pico de flauta y se cosecha ocho horas después de sembrada, asegurando una viabilidad del 100%. Las *cándidas* se lavan con buffer PBS para eliminar residuos, centrifugando diez minutos a 400g. Se resuspenden en PBS agitando en Vortex para obtener microorganismos aislados en una suspensión homogénea y se ajusta a la concentración de 1×10^6 *cándidas*/ml en PBS. Luego se procede a realizar el ensayo.

- 1- Colocar 10 μ l de una suspensión de 10^6 *cándidas* en cada wells de un portaobjeto de 7 wells. Dejar secar.
- 2- Agregar 20 μ l de suero diluído 1/16- 1/32- 1/ 64- 1/128- 1/256- 1/512- negativo en cada wells. Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en cámara húmeda.

- 3- Lavar 5 minutos con PBS. (Repetir 2 veces). Secar los bordes.
- 4- Agregar 20ul de suero anti Fc- FITC (dilución 1/100). Incubar 30 minutos a temperatura ambiente en oscuridad en cámara húmeda.
- 5- Lavar 5 minutos con PBS. (Repetir 2 veces). Secar los bordes.
- 6- Montar con 1 gota de glicerina bufferada.
- 7- Observar en microscopio de Inmunofluorescencia. La imagen es positiva si permite ver fluorescente el contorno de la levadura.



- 1) ¿Qué técnicas de screening conoce para toxoplasmosis?
- 2) Con esa sola prueba serológica, ¿podría usted informar el resultado? Justifique
- 3) En el caso de tener que confirmar dicho resultado, ¿qué técnica emplearía? ¿Referido al práctico, qué buscaría con esa técnica? ¿Qué espera observar?

CASO CLÍNICO N° 3.

Paciente del sexo masculino de 50 años de edad que concurre por molestias oculares siendo diagnosticada una conjuntivitis folicular.

El paciente alega haber tenido uretritis a repetición causadas por *Chlamydia trachomatis*.

- 1) ¿Qué muestra podría llegarnos al laboratorio?
- 2) De acuerdo a la muestra que tenemos ¿qué podríamos buscar?
- 3) Haga un esquema de los distintos pasos que realizaría desde recibida la muestra, en la técnica utilizada.

CASO CLÍNICO N° 4

Paciente de 10 años que acude al Servicio de Urgencia con fiebre, náuseas, vómito y refiere orinar muy oscuro. Se solicita análisis de orina que revela:

Color: coca cola

Proteínas: ++

Hemoglobina: ++++

En el sedimento se observan:

Abundantes hematíes dismórficos y escasos cilindros granuloso fino. No se observan cilindros hemáticos.

Determine:

- 1- Diagnóstico presuntivo
- 2- Datos de laboratorio que permiten confirmar el diagnóstico

CASO CLÍNICO N° 5

Paciente de sexo masculino de 50 años de edad que concurre al médico por presentar mialgias y artralgias, fiebre; compromiso cutáneo, evidenciando lesiones de tipo vasculíticas. Además, compromiso pulmonar donde la radiografía de tórax mostró formación de nódulos.

El sedimento urinario mostró un perfil inflamatorio.

Los datos del laboratorio indicaron:

VSG: 20 mm/h

VR: (1-13 mm/h.)

PCR: 48 mg/l

Método: aglutinación indirecta. VR: (6 mg/l)

Plaquetas: 700.000/ mm³

VR: 150.000 a 400.000/mm³

El estudio histopatológico demuestra presencia de granulomas.

- 1) Teniendo en cuenta la clínica del individuo y los datos del laboratorio, ¿cuál sería el diagnóstico presuntivo?
- 2) Se realizó estudio de ANCA a dicho individuo, ¿Qué tipo de patrón observaría? En caso de realizar el ensayo con neutrófilos fijados con formalina, ¿se observaría diferencia? Justifique.
- 3) ¿Qué tipo de técnica es? ¿Qué imagen espera encontrar? Realice un algoritmo.
- 4) En el caso de que la técnica de ANCA realizada de resultado positivo, ¿con qué técnica confirmaría?

CASO CLÍNICO N° 6

Paciente de sexo femenino de 35 años que hace 15 años empezó con rinitis alérgica y hace 3 años que manifiesta asma bronquial.

Datos del laboratorio muestran:

HTO: 36 %

VR: 43-52% (H) 37-48% (M).

VSG: 18 mm/h

VR: (1-13 mm/h.)

GR: 4,537x10⁶ GR/mm³ VR: 4,2x10⁶-5,5x10⁶ GR/mm³ (H)

3,6x10⁶-5,1x10⁶ GR/mm³ (M)

El estudio histopatológico demostró la presencia de granulomas e infiltración de tejidos por eosinófilos.

- 1) Teniendo en cuenta la clínica del individuo y los datos del laboratorio ¿cuál sería el diagnóstico presuntivo?
- 2) Se realizó estudio de ANCA a dicho individuo, ¿Qué tipo de patrón seguiría? En caso de realizar el ensayo con neutrófilos fijados con formalina, ¿se observaría diferencia? Justifique.
- 3) ¿Qué tipo de técnica es? ¿Qué imagen espera encontrar? Realice un algoritmo.
- 4) En el caso de que la técnica de ANCA realizada de resultado positivo, ¿con qué técnica confirmaría?

INVESTIGUE

- Detalle la técnica de inmunofluorescencia directa (IFD). Dar un ejemplo de aplicación para células fijadas a un soporte o cortes histológicos (improntas) y para suspensiones celulares. ¿Qué método de detección se usa en cada caso? ¿Cómo titularía el conjugado?
- Idem para inmunofluorescencia indirecta (IFI).
- ¿Cómo se expresan los resultados? Enumerar y detallar todos los controles de reacción necesarios. ¿Es una técnica cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa?
- Dar ejemplos de aplicaciones clínicas de estas técnicas.
- ¿En qué consiste la citometría de flujo? ¿Cuáles son las aplicaciones en el diagnóstico clínico?

INFORME

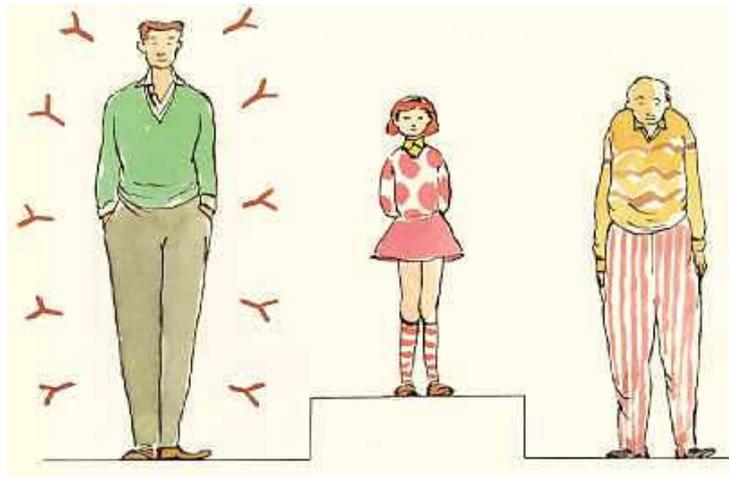
- Realizar un informe grupal a partir de la investigación individual.
- Interpretar los resultados obtenidos a partir del paciente en estudio.
- Interpretar los casos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA

- Margni RA. Inmunología e Inmunoquímica. Fundamentos. 5º Edición. Editorial Médica Panamericana. 1996. ISBN 8479033177.
- Roitt I, Brostoff J, Male D. Inmunología. 5º Edición. Español. Editorial Harcourt. 2000. ISBN 8481744972.
- Roitt IM, Delves PJ. Inmunología. Fundamentos. 11º Edición. Editorial Médica Panamericana. 2008. ISBN 978-950-06-0899-2.
- Rose, Conway de Macario, Fahey, Friedman and Penn. Manual of Clinical Laboratory Immunology. Fourth Edition. 1992. American Society for Microbiology.
- Stites DP. Inmunología Básica y Clínica. 10º Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003. ISBN 9684269978.

TRABAJO PRÁCTICO N°9

TEST DE MICROLINFOCITOTOXICIDAD



OBJETIVOS

- Que el alumno aprenda a ver en forma práctica la activación del complemento por la vía clásica, con su consecuencia final la formación del MAC (complejo de ataque a la membrana) y lisis de la membrana celular.
- Reconocer células vivas de muertas por tinción con diferentes colorantes vitales.
- Diferenciar la presencia de anticuerpos IgG de IgM
- Detectar la presencia de bajos títulos de anticuerpos.
- Obtener linfocitos de sangre periférica
- Separar distintas subpoblaciones de linfocitos (T/B)
- Interpretar los resultados en las distintas situaciones planteadas y discutir la conducta a seguir

INTRODUCCIÓN

Los anticuerpos anti- MHC citotóxicos se pueden originar después de transfusiones de sangre, trasplantes de órganos o durante el embarazo. La presencia de estos anticuerpos son responsables en un trasplante del RECHAZO HIPERAGUDO.

Esta prueba cruzada denominada CROSSMATCH se realiza siempre previa a un trasplante entre el dador y su receptor, y su objetivo es determinar la presencia de anticuerpos preformados dirigidos al MHC evitando así el rechazo hiperagudo.

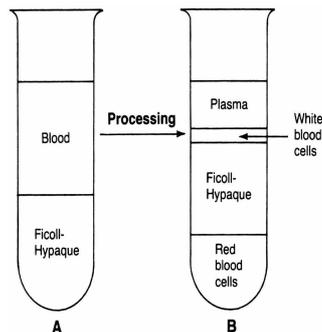
Todo paciente con IRC terminal inscripto en lista de espera en el INCUCAI para acceder a un trasplante con donante cadavérico se realiza cada 3 meses esta prueba enfrentando su suero a un panel de linfocitos, esta técnica se conoce como CROSSMATCH FRENTE A PANEL O ANTICUERPOS REACTIVOS FRENTE A PANEL (PRA) y tiene como único objetivo evaluar el nivel de sensibilización de los pacientes.

Principio de la prueba de linfocitotoxicidad

El principio de este método se basa en la lisis celular mediada por anticuerpos específicos en presencia de complemento. La muerte celular es un indicador de especificidad común del antígeno y anticuerpo, constituyendo una prueba positiva.

Se utiliza como fuente de antígenos una suspensión de linfocitos y como fuente de anticuerpos suero.

Los linfocitos son obtenidos a partir de sangre periférica con el método de gradiente de densidad, utilizando Ficoll-Triyosom (densidad 1.077 g/ml), ajustando su concentración a 2×10^5 células /ml.



Los linfocitos son incubados con el suero del paciente y con complemento procedente del conejo. Si el anticuerpo está presente, la adición del suero en presencia del complemento conduce a la lisis de los linfocitos. Esta se visualiza con un colorante (por ej., eosina). La valoración de los linfocitos lisados y vitales tiene lugar con un microscopio inverso de contraste de fases, óptico o con adaptación para inmunofluorescencia.

MATERIALES Y MÉTODO

- Pipetas Pasteur,
- tubos cónicos,
- portaobjetos y cubreobjetos,
- centrífuga con cabezal móvil,
- cámara de Neubauer y cubrecámara,
- microscopio óptico común con adaptación para Inmunofluorescencia o microscopio invertido con contraste de fase,
- muestra de sangre con EDTA,
- PBS,
- solución fisiológica,

- Ficoll-Triyosom,
- CFDA,
- suero de paciente con anticuerpos anti- HLA,
- complemento de conejo,
- bromuro de etidio,
- glicerina buffereada,
- eosina o azul de trypán,
- formol.

1. CITOTOXICIDAD Y OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO DE FLUORESCENCIA

- 1- 2ml de sangre entera con anticoagulante.
- 2- Centrifugar a bajas revoluciones: 10 minutos a 1500 rpm
- 3- Con pipeta Pasteur tomar aprox. 0,5 ml de la interfase.
- 4- Colocar en un tubo y agregar 1,5 ml de PBS (relación 1+ 3)
- 5- A 0,5 ml de Ficoll-Triyosom agregar 1,5 ml de sangre obtenida en el punto 4, lentamente por las paredes del tubo, para que queden bien delimitadas ambas fases y se pueda realizar un correcto gradiente.
- 6- Centrifugar en centrífuga de cabezal móvil durante 15' a 2500 rpm.
- 7- Después de la centrifugación quedan formadas 4 fases: plasma-mononucleares- Ficoll-Triyosom – eritrocitos y PMN. Separar la capa de mononucleares con pipeta Pasteur.
- 8- Colocar en un tubo limpio y agregar 2 ml de PBS. Homogeneizar y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Repetir el lavado.
- 9- El pellet del último lavado se resuspende en 50 µl de PBS y contar en cámara.
- 10- Colocar 10^6 células en un tubo y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 11- Al pellet agregar 50 ul de CFDA (50 µg/ml en PBS). Incubar 15 minutos a 37°C en oscuridad.
- 12- Lavar con 2 ml de PBS. Centrifugar a 3500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
- 13- Agregar 20µl de suero (suero de paciente con anticuerpos anti- HLA). Incubar 45 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- 14- Lavar con 2 ml de PBS. Centrifugar a 3500 rpm. Eliminar el sobrenadante.

- 15- Agregar 50µl de complemento. Incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
- 16- Agregar 50 µl de Bromuro de Etidio- EDTA.
- 17- Montar sobre porta y cubre con 1 gota de glicerina bufferada.
- 18- Observar en microscopio de Inmunofluorescencia.

CITOTOXICIDAD Y OBSERVACIÓN EN MICROSCOPIO ÓPTICO

- 1- 2 ml de sangre entera con anticoagulante.
- 2- Centrifugar a bajas revoluciones: 10 minutos a 1500 rpm
- 3- Con pipeta Pasteur tomar aprox. 0,5 ml de la interfase.
- 4- Colocar en un tubo y agregar 1,5 ml de PBS (relación 1+ 3)
- 5- A 0,5ml de Ficoll-Tryosom agregar 1,5 ml de sangre obtenida en el punto 4, lentamente por las paredes del tubo, para que queden bien delimitadas ambas fases y se pueda realizar un correcto gradiente.
- 6- Centrifugar en centrífuga de cabezal móvil durante 15' a 2500r pm.
- 7- Después de la centrifugación quedan formadas 4 fases: plasma-
mononucleares- Ficoll-Triyosom – eritrocitos y PMN. Separar la capa de mononucleares con pipeta Pasteur.
- 8- Colocar en un tubo limpio y agregar PBS. Homogeneizar y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Repetir el lavado.
- 9- El pellet del último lavado se resuspende en 50 µl de PBS y contar en cámara.
- 10- Colocar 10⁶ células en un tubo y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 11- Agregar 20 µl del suero del paciente e incubar 45 minutos a temperatura ambiente.
- 12- Lavar con 2 ml de PBS. Centrifugar a 3500 rpm. Eliminar el sobrenadante.
- 13- Agregar 50 µl de complemento e incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
- 14- Agregar 50 µl de eosina ó azul de tripán y 50 µl de formol.
- 15- Montar sobre porta y cubre.
- 16- Observar en microscopio óptico común

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

Mujer de 22 años consulta a su clínico por tener familiar directo (padre) con diagnóstico de Espondilitis Anquilosante solicitándole realizarse la detección del antígeno HLA B27, tras haber leído en un foro en Internet un comentario relacionado. La paciente se encuentra totalmente asintomática.

- Explique ¿cómo realizaría la tipificación del Ag HLA B27 por la técnica de microlinfotoxicidad?
- Según lo que refiere la paciente, ¿considera necesaria la realización del test?
- Comente la detección de HLA B27 por otros métodos.

CASO CLÍNICO N° 2

Paciente de 30 años de edad, en hemodiálisis por 3 años. Tiene como antecedentes: IRC por esclerosis focal y segmentaria. Ingresa al laboratorio como receptor potencial de un riñón.

- ¿Qué análisis comprende el estudio pretrasplante?
- Analice la siguiente las siguientes placas de un crossmatch dador-receptor, considere:
 - Siempre la columna 1 tiene células del receptor (las demás células del donante)
 - Columna 2, linfocitos totales del donante
 - Columna 3, linfocitos T
 - Columna 4, linfocitos B y suero adsorbido con plaquetas
 - Columna 5, controles (con linfocitos totales y suero puro)
 - Fila A, suero puro
 - Fila B, suero diluído ½
 - Fila C, suero diluído ¼
 - Fila D, con AGH
 - Fila E, suero tratado con DTT

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	
-	+	+	-	+						A

-	+	+	-	+						B
-	+	+	-	+						C
-	+	+	-	-						D
-	+	+	-	-						E

c) ¿Este resultado invalida el trasplante? Justifique.

CASO CLÍNICO N° 3

Paciente 28 años concurre al laboratorio con pedido de crossmatch. Refiere estar en pareja hace 5 años y haber tenido tres abortos espontáneos en los últimos 12 meses.

a) Explique factores inmunológicos involucrados en la etiología del aborto a repetición.

¿Qué tipo de crossmatch le realizaría?

b) Comente brevemente alternativas terapéuticas.

c) ¿En qué consiste el cultivo mixto linfocitario?

CASO CLÍNICO N°4

Paciente de 30 años que a los 12 años recibió un trasplante con donante vivo relacionado (madre). Hace algunos años ingresa a diálisis como consecuencia de la extirpación del riñón trasplantado. Se solicita cross-match frente a panel para ingreso a lista de espera, informando el laboratorio CMFP con y sin DTT para Linfocitos totales positivo: 100%.

a) ¿Está de acuerdo con el resultado? Justifique.

b) Ante un resultado de esta magnitud ¿Puede recibir un trasplante? Justifique

c) Explique brevemente conducta terapéutica a seguir

CASO CLÍNICO N°5

Paciente de 18 años con traumatismo de cráneo que ingresa al Servicio de Terapia Intensiva del H.Escuela. Con diagnóstico de Muerte cerebral los familiares aceptan donar los órganos.

a) ¿Qué órganos pueden donarse? ¿Qué ocurre si el paciente falleció en su casa por muerte súbita?

b) ¿Qué estudios de laboratorio deben realizarse al donante? ¿Qué resultados de laboratorio invalidan la donación? justifique

c) ¿Cómo se seleccionan los receptores?

CASO CLÍNICO N°6

Se realiza un operativo de Ablación de órganos PD 47028. Los órganos donados: son: corazón- hígado- riñón, páncreas, córneas.

- a) ¿En qué casos es necesario realizar el cross-match donante- receptor?
- b) ¿En qué casos utilizaría Citometría de Flujo. Explique brevemente la metodología.
- c) ¿En qué casos se realiza el estudio de histocompatibilidad? ¿Puede hacerse por técnica de microlinfocitotoxicidad? Ventajas y desventajas.

INVESTIGUE

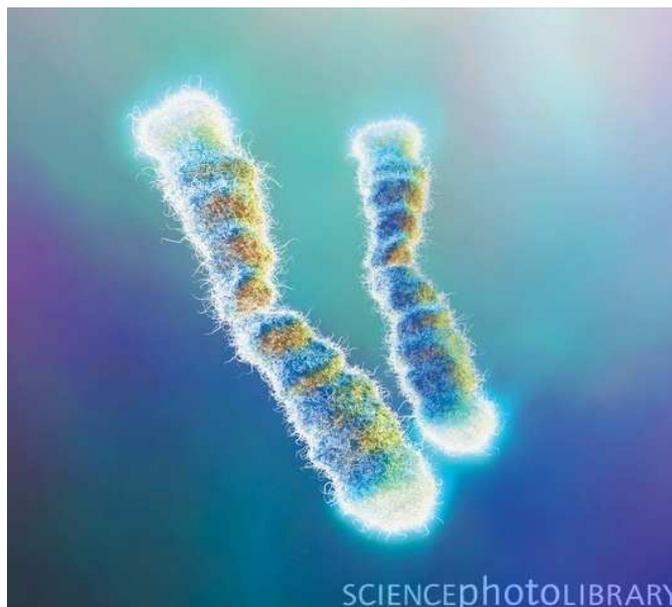
- Principio de separación de los diferentes componentes celulares con la mezcla de Ficoll-Tryosom.
- Otros métodos de separación de componentes celulares en sangre periférica, médula ósea, biopsia de ganglio linfático, bazo.
- ¿Cómo realiza el ensayo utilizando la técnica convencional, con placas Terasaki?
- Utilidad del azul tripán, DDT y AGH.
- Ventajas de utilizar suero fresco de conejo como fuente de complemento. Fundamento de su preparación para el ensayo.
- Fundamento de la utilización del suero del paciente en diluciones seriadas.
- Utilidad de la eosina y el formol.
- Características diferenciales de la placa Terasaki, utilizada en los ensayos de microlinfocitotoxicidad, respecto a otras placas descartables utilizadas en serología.
- Diferencias entre el microscopio óptico y el invertido con contraste de fase.
- Utilidad clínica de la prueba.

INFORME

- Realizar un informe grupal a partir de la investigación individual.
- Interpretar los resultados obtenidos a partir del paciente en estudio.
- Interpretar los casos clínicos.

TRABAJO PRÁCTICO N°10

BIOLOGÍA MOLECULAR:
CONCEPTOS BÁSICOS



METODOLOGÍAS MOLECULARES DE DIAGNÓSTICO

Objetivos:

- _ Describir la importancia y el uso actual de las técnicas moleculares en el análisis de patologías.
- _ Desarrollo de la técnica de extracción de ADN con CTAB.

INTRODUCCIÓN

Con la estructura del ADN a disposición (1953), en la actualidad, la aplicación de biología molecular al estudio de la genética humana ha dado lugar a un crecimiento sin precedente en nuestro entendimiento del mecanismo básico de la enfermedad y las bases del nuevo campo clínico de la medicina molecular, ya que las bases genéticas de un gran número de enfermedades se están identificando, lo cual tendrá un impacto importante para el diagnóstico, pronóstico, y manejo confidencial de pacientes.

MÉTODOS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

Hibridación molecular

La hibridación se refiere al apareamiento específico que ocurre entre cadenas de ácidos nucleicos con secuencias complementarias, proceso que es análogo a la reacción antígeno-anticuerpo, pero con la diferencia de que en la hibridación en lugar de anticuerpos se emplean las llamadas sondas (Mercado & Gamba, 1997). Las sondas no son más que fragmentos cortos de ADN o ARN sintetizados *in vitro* y que se marcan con sustancias radiactivas fluorescentes o de otro tipo a fin de hacer posible su posterior detección y de esta manera la identificación de la secuencia de ADN o ARN de interés (Cerezo & Madrid, 1995; Mercado & Gamba).

Southern blot

Es una técnica empleada para detectar secuencias específicas de ADN. Para llevar a cabo hibridaciones de este tipo, se aísla el ADN de un tejido o línea celular, luego se purifica, y se digiere con enzimas de restricción específicas. Los fragmentos generados se separan mediante electroforesis y después son transferidos a la

membrana que sirve de soporte (gel de agarosa). Este proceso se lleva a cabo colocando el gel de agarosa sobre papel filtro previamente remojado en una solución llamada de transferencia (solución salina concentrada). A continuación se sitúa la membrana sobre el gel y encima de esta una pila de papel filtro seca, y por capilaridad la solución de transferencia es atraída a la pila de papel filtro, arrastrando consigo al ADN hacia la membrana, donde queda inmovilizado conservando la misma posición relativa que ocupaba en el gel. Luego, el ADN puede ser hibridado en la membrana con una sonda marcada (Cerezo & Madrid, 1995; Correa-Rotter & Gamba, 1997).

Esta técnica se ha empleado para el diagnóstico y caracterización de diversas inmunodeficiencias, la distrofia muscular de Duchenne, la hipoplasia adrenal congénita, la deficiencia de glicerol-quinasa, la distrofia miotónica severa y en análisis de mutaciones de genes en células B de leucemia linfoblástica crónica, entre otras enfermedades (Cerezo & Madrid, 1995).

Northern blot

Es una variante del método anterior en el que en lugar de utilizar ADN como sustrato de estudio, se emplea ARN. El procedimiento que se sigue es similar al Southern blot y por analogía con este se le conoce como Northern blot. Esta técnica se ha aplicado en estudios de la modulación de la síntesis de interleucina 6 en pacientes con artritis reumatoide, en el análisis de expresión de receptores que participan en la síntesis de moléculas en cultivos celulares, en análisis de mutaciones y alteraciones del RNAm de enzimas, y en la regulación de la expresión génica de marcadores moleculares de células leucémicas humanas y moléculas del reconocimiento inmunológico (Cerezo & Madrid, 1995).

Western blot

No es un método de análisis directo de los ácidos nucleicos, sino del producto de la expresión de los genes, o sea las proteínas. Aunque difiere de los anteriores en cuanto a que no existe hibridación, sino que la identificación de las proteínas se realiza con anticuerpos marcados, sí se mantiene el principio de la transferencia a la membrana que sirve de soporte posterior a la electroforesis y previo a la identificación, y por lo cual siguiendo el juego de palabras ha sido denominado de esta manera (Cerezo & Madrid, 1995; Mercado & Gamba, 1997). Esta técnica permite el desarrollo de pruebas para diferenciar tipos de virus que infectan a células, se ha aplicado en

estudios de la variabilidad individual de los niveles de determinadas enzimas, en la caracterización molecular de genes (Cerezo & Madrid), etc.

Dot blot y slot blot

Son procedimientos similares al Northern con la diferencia de que el ARN no es sometido a electroforesis sino que se sitúa directamente sobre la membrana. Este tipo de análisis requiere de un molde asociado a succión con vacío para colocar el ARN que puede producir círculos o puntos (dot blot) o hendiduras (slot blot). Este tipo de prueba es muy útil cuando se quieren estudiar gran número de muestras, pero tienen la limitante de no ofrecer información sobre el tamaño de las bandas del ARN hibridado (Correa-Rotter & Gamba, 1997).

Hibridación *in situ*

Es un método histoquímico que emplea a la biología molecular de la misma manera que la inmunohistoquímica utiliza los métodos de la inmunología. La especificidad de la hibridación *in situ* (HIS) se basa en la unión recíproca de una secuencia de oligonucleótidos (la sonda), con una secuencia complementaria de nucleótidos presente en las moléculas de ARN o ADN dentro del tejido (Quintanilla-Martínez & Gamba, 1997).

La HIS con fluorescencia (FISH) (Hogge & Mowery-Rushton, 1997; Bobadilla & Gamba, 1996) es una importante herramienta de uso rutinario en investigación y con grandes posibilidades de aplicación en el diagnóstico de enfermedades neoplásicas, genéticas, estudios a nivel cromosómico, etc. En ella la sonda se marca con sustancias fluorescentes que se visualizan después mediante microscopía.

Mapas de restricción

Esta técnica se basa en el principio de la enzimología de restricción donde de una molécula de ADN dada se obtendrán siempre los mismos fragmentos cada vez que sea expuesta a una enzima de restricción particular. La complejidad del mapa depende del tamaño de la molécula (a mayor número de bases será mayor el número de sitios de restricción) y del número de enzimas utilizadas. De esta forma, dos moléculas de ADN del mismo tamaño pueden ser fácilmente diferenciadas por los mapas de restricción que producen al tratarlas con las mismas enzimas (Merino & Gamba, 1996).

Este mismo principio lo utiliza el procedimiento denominado análisis de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) (Granner, 1992), pero aprovechando el hecho de la existencia de variaciones en la constitución genética de la población (polimorfismo genético), que hace que se observen diferencias entre los individuos en cuanto al número y longitud de los fragmentos producidos. La existencia de los RFLPs es la base de la técnica que se ha denominado *huellas digitales del ADN* y que permite establecer inequívocamente la relación padres e hijos, entre otras aplicaciones.

AMPLIFICACIÓN IN VITRO DE ÁCIDOS NUCLEICOS POR LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR desarrollada por Kary Mullis, permite el análisis de ADN y ARN presente en un bajo número de copias, en muestras clínicas. El fundamento de la reacción es la amplificación enzimática de un fragmento de ADN flanqueado por dos cebadores o “primers” (secuencia de nucleótidos), que hibridan con las cadenas opuestas de la secuencia nucleotídica de interés.

El método consiste en tres etapas de diferentes temperaturas, que se repiten entre 25 a 30 veces, según los diferentes protocolos de laboratorio. La primera etapa, a 95 °C, desnatura el ADN, la segunda permite mediante la elección de la temperatura la hibridación de los cebadores al ADN, delimitando la zona de interés, luego en la tercera etapa la polimerasa sintetiza la nueva cadena de ADN (etapa de elongación). Cada ciclo duplica la cantidad de ADN sintetizada en el anterior, por lo tanto la amplificación resulta exponencial, elevando así su sensibilidad por encima de las técnicas convencionales.

MATERIALES Y MÉTODO

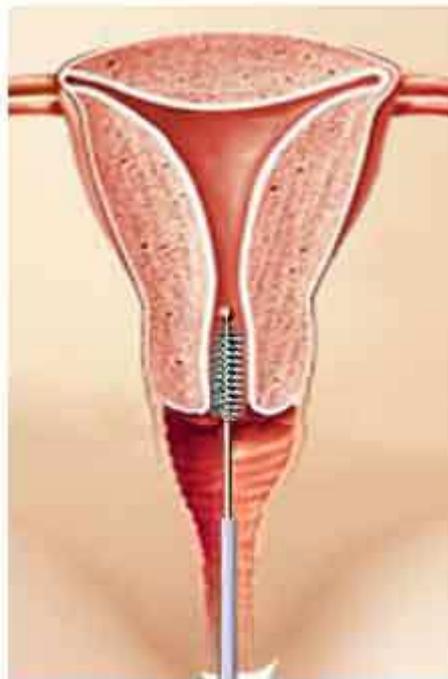
Protocolo de extracción de ADN de sangre y cepillo ginecológico (citobrush) con CTAB

1. El cepillado puede llegar al laboratorio en buffer PBS estéril o agua destilada estéril (material de hisopado o cepillado).

2. Si la muestra llega con el cepillo o el hisopo, retirar el mismo tratando de dejar todo el material posible en el tubo con el buffer.
3. Centrifugar el material (buffer con la muestra disuelta o en suspensión) a 3000 rpm durante 5 minutos.
4. Descartar el sobrenadante y resuspender el pellet en 200 o 300 μ l de PBS estéril (la cantidad es sugerida, pudiendo variar según el criterio del que procesa la muestra). Volver a centrifugar según el paso 2. Proceder según ítem 6.
5. Para el caso de sangre, deben lisarse los eritrocitos previamente con buffer lisis, hasta obtener un pellet limpio (blanquecino). Luego proceder según ítem 7.
6. Repetir el lavado hasta que el pellet sea limpio. Si no se va a continuar con la extracción de ácidos nucleicos, puede interrumpirse en este punto, congelando el pellet de células a -20°C (por semanas o meses).
7. Resuspender el pellet de células en 50-700 μ l de solución de homogeneización (CTAB) dependiendo del tamaño. (alrededor de 4 volúmenes).
8. Agitar bien la suspensión celular (puede usarse vortex). Incubar 1-2 horas a 60°C . Repetir ocasionalmente la agitación durante este tiempo. Si no se va a continuar con la purificación de ácidos nucleicos, puede interrumpirse en este punto y congelar -20°C (por semanas).
9. Extraer las proteínas con un volumen de *cloroformo:isoamílico* (24:1). Este procedimiento se realiza 3 veces. Centrifugar entre cada extracción a 10000 rpm durante 5 minutos para separar las fases. La fase superior es la fase acuosa y por lo tanto es la que contiene DNA en solución. Esta deberá ser trasvasada con cuidado a otro tubo eppendorf para hacer la siguiente extracción, teniendo cuidado de no arrastrar las proteínas que normalmente se encuentran en la interfase *cloroformo:agua*
10. Precipitar el ADN de la última fase acuosa trasvasada con un volumen de alcohol isopropílico o etanol absoluto frío, durante media a una hora a temperatura ambiente o en freezer (en alcohol el ADN es estable y se lo puede dejar precipitando ON).
11. Centrifugar 15 minutos a 13000 rpm, descartar el sobrenadante y lavar el pellet con etanol 70%-acetato de amonio 10mM frío. Centrifugar a 13000 rpm por 5

minutos. Secar el pellet con el cono eppendorf boca abajo sobre papel adsorbente, 24 hs aproximadamente.

12. Resuspender el pellet en 50 μ l de agua estéril o buffer TBE (para facilitar una buena resuspensión se puede colocar el tubo a 52°C por 15 minutos).



ORGANIZACIÓN DE SEMINARIOS ORALES (PRESENTACIÓN EN PPT):

La comisión correspondiente se dividirá en dos grupos de trabajo que abordarán los temas siguientes:

- _ Extracción de ADN y amplificación por técnica de PCR: Aspectos técnicos y teóricos. Variedad de técnicas. Revelado del producto.
- _ Diagnóstico molecular en patologías infecciosas: Exposición de dos casos clínicos.

BIBLIOGRAFÍA:

- **Watson J, Tooze J, Kurtz D.** ADN Recombinante. Edit. Labor. 5:20-25. 1988.
- **Lodish, Berk, Zipursky, Baltimore.** Molecular Cell Biology. Edit Media Connected. 4º Edition. 7: 191-196. 2000.
- **Susuky, Griffit, Muller, Lewontin.** Genética. Edit Mc Graw Hill. 15:403-414.1989.
- **Boxer M. 2000.** Molecular Techniques: divide or share. J Clin Pathol. 53:19–21.
- **Darden L y Tabery J.** 2005. Molecular biology. Stanford Encyclopedia Philosophy. Metaphysics Research Lab, CSLI, Stanford University.
- **Goering RV.** 1993. Molecular epidemiology of nosocomial infection: analysis of chromosomal restriction fragment patterns by pulsed-field gel eletrophoresis. Infect Control Hosp Epidemiol, 14: 595-600.
- **Goering RV. 2000.** The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. Reviews in Medical Microbiology, 11(3): 145-152.