

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

INMUNOLOGIA CLÍNICA 2010

**PROFESOR RESPONSABLE:
Mg 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

Colaboradores:

Bioquímico Emiliano Sotelo

Bioquímica Cinthia Ortowsky

Alumna Cecilia Urquijo

Alumna Victoria Iván

Alumno Héctor Escobar

INMUNOLOGIA CLÍNICA

Año 2010

Al lector:

La **INMUNOLOGÍA** es una rama amplia de la biología y de las ciencias biomédicas que se ocupa del estudio del SISTEMA INMUNE en todos los organismos, entendiendo como tal al conjunto de órganos, tejidos y células que en los vertebrados tienen como función biológica el reconocer elementos extraños o ajenos dando una respuesta (respuesta inmunológica).

La ciencia trata, entre otras cosas, el funcionamiento fisiológico del sistema inmune tanto en estadios de salud como de enfermedad; las alteraciones en las funciones del sistema inmunitario en los desórdenes inmunológicos (enfermedades autoinmunes, hipersensibilidades, deficiencias inmunológicas, rechazo a los trasplantes); las características físicas, químicas y fisiológicas de los componentes del sistema inmunológico *in vitro*, *in situ*, e *in vivo*.

¿Qué es el SISTEMA INMUNE?

El SISTEMA INMUNE (SI) es un sistema altamente eficiente responsable de la resistencia frente a los diferentes agentes infecciosos y del mantenimiento de la homeostasis del medio interno. Está formado por un conjunto de mecanismos que protegen al organismo de infecciones por medio de la identificación y eliminación de agentes patógenos. Debido a que los patógenos abarcan desde virus hasta gusanos parásitos intestinales, esta tarea es extremadamente compleja y las amenazas deben ser detectadas con absoluta especificidad distinguiendo los patógenos de las células y tejidos normales del organismo. A ello hay que sumar la capacidad evolutiva de los patógenos que les permite crear formas de evitar la detección por el sistema inmunológico e infectar al organismo hospedador.

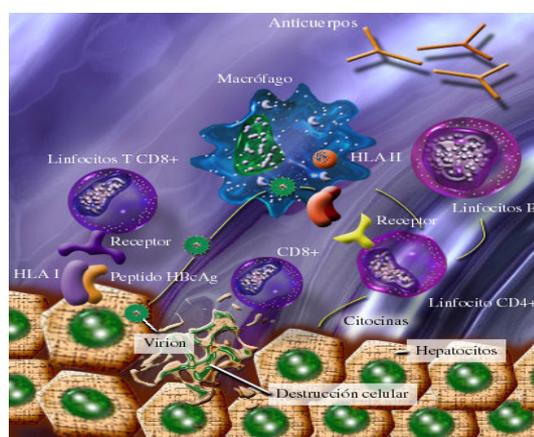
Para protegerse, los organismos vivos han desarrollado varios mecanismos para reconocer y neutralizar patógenos. Incluso los microorganismos simples —como las bacterias— poseen un sistema de enzimas que las protegen contra infecciones virales. Otros

mecanismos inmunológicos básicos evolucionaron en las antiguas células eucariotas y permanecen hoy en sus descendientes modernos: plantas, peces, reptiles e insectos. Estos mecanismos incluyen péptidos antimicrobianos llamados defensinas, el proceso de fagocitosis y el sistema del complemento, constituyendo lo que se conoce como INMUNIDAD NATURAL.

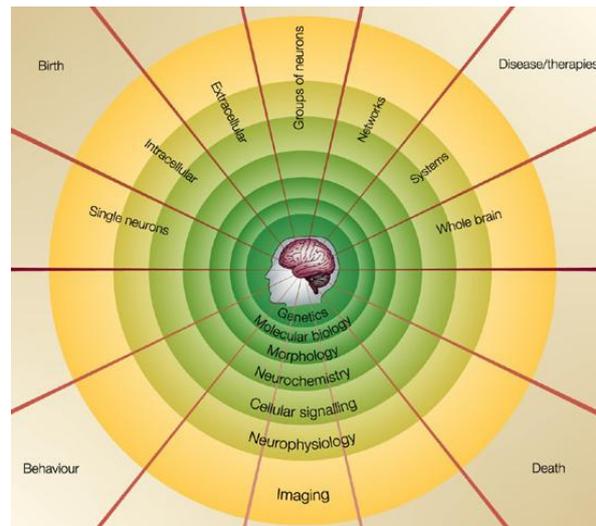
Sin embargo, los mecanismos más sofisticados se desarrollaron más recientemente de forma conjunta con la evolución de los vertebrados. El sistema inmunológico de los vertebrados —como el de los seres humanos— comprende varios tipos de proteínas, células, órganos y tejidos, que interactúan en una red elaborada y dinámica. Esta respuesta inmune más compleja que se manifiesta en los vertebrados incluye la capacidad de adaptarse para así reconocer patógenos concretos en forma más eficiente. El proceso de adaptación crea memorias inmunológicas y permite brindar una protección más efectiva durante futuros encuentros con estos patógenos, lo que se conoce como INMUNIDAD ADQUIRIDA y es la base de la vacunación.

Los desórdenes en el sistema inmunológico pueden causar enfermedades. Las enfermedades relacionadas con la inmunodeficiencia ocurren cuando el sistema inmunológico es menos activo de lo normal, dando lugar a infecciones que pueden poner en peligro la vida. La inmunodeficiencia puede ser el resultado de el estrés crónico, de una enfermedad genética, como la "inmunodeficiencia severa combinada", o ser producida por fármacos o una infección, como el síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), causado por el virus de inmunodeficiencia humana (VIH). En contraposición, las enfermedades autoinmunes son producidas por un sistema inmunológico hiperactivo que ataca tejidos normales como si fueran organismos extraños. Las enfermedades autoinmunes incluyen artritis reumatoide, diabetes mellitus tipo 1 y Lupus eritematoso.

El sistema inmunológico es objeto de intensos estudios científicos debido al papel crítico que desempeña en la salud humana.



NUEVOS DESAFÍOS: PSICONEUROINMUNOLOGÍA



Es el estudio de las interrelaciones entre el Sistema Nervioso Central (SNC) y el Sistema Inmune (SI). Se utiliza el término interrelación porque se asume que la relación es bidireccional. Las investigaciones con animales han ofrecido evidencias de la existencia de nervios que conectan el SNC y el SI, de alteraciones neuroendócrinas que alteran funciones inmunológicas inducidas, y de la existencia de productos químicos llamados citocinas producidas por el SI que atraviesan la barrera hematoencefálica, y alteran las funciones del SNC.

Robert Ader al establecer el vínculo conductual entre el sistema nervioso y el sistema inmune sentó las bases de la INMUNOLOGÍA CONDUCTUAL. En estudios con humanos el foco principal de atención se ha puesto en establecer si existe asociación entre características psicológicas (rasgos o estados) y la inmunidad, qué vías de conexión - biológicas y conductuales - pueden explicar dicha relación y si las alteraciones inmunitarias inducidas psicológicamente son responsables de la susceptibilidad a enfermarse (enfermedades en las que está implicado el sistema inmune).

Debemos recordar que para que se produzca la enfermedad no basta con la invasión del organismo por parte del agente invasor. Debe darse que las defensas sean incapaces de mantener dicho agente inactivo, o eliminarlo. Es de esta forma como las variables psicológicas que afectan la inmunidad pueden influir en la aparición curso y desenlace de enfermedades mediadas por el sistema inmune. No sabemos de qué tipo y magnitud deben ser los cambios producidos para que se vea alterada la posibilidad de defensa del organismo.

Los factores psicológicos pueden influir en la respuesta inmune mediante inervación con precedencia directa del SNC o por mecanismos hormonales. Los cambios de conducta, asociados a características de personalidad a procesos de adaptación o de afrontamiento frente a situaciones estresantes, o estados emocionales negativos también pueden alterar la inmunidad. Es así que una persona ante problemas emocionales puede fumar, alimentarse de forma inadecuada o desarrollar malos hábitos respecto al sueño, lo cual puede tener consecuencias inmunosupresoras.

¿Cuáles son los objetivos del curso de INMUNOLOGIA CLINICA?

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?

Etapas preanalíticas: registro de datos, recolección preparación y conservación de la muestra...

Etapas analíticas: manejo de la muestra, bioseguridad, calidad operacional, control de calidad interno y externo...

Etapas postanalíticas: 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/bioquimica/inmunoclinica>, en la que podrán encontrar toda la información de la asignatura.

Debemos destacar, que si bien el multimedia es una herramienta didáctica útil para el desarrollo de las actividades de la asignatura, los contenidos de las filmas **NO REEMPLAZAN** a los libros.

BIENVENIDOS

PLANTEL DOCENTE de INMUNOLOGIA 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

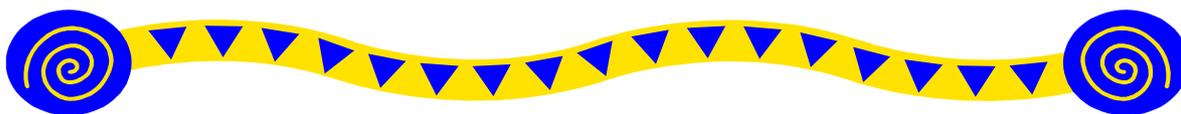
Emiliano Sotelo: jesr5@hotmail.com

Cinthia Ortowski: cinthia.cecilia@gmail.com

Cecilia Urquijo: maceciliaurquijo@hotmail.com

Victoria Iván: mariavic2004@hotmail.com

Héctor Escobar: hectorescobar22@hotmail.com



MANUAL DE
PROCEDIMIENTOS PARA
LABORATORIOS DE
DIAGNÓSTICO

NORMAS DE
BIOSEGURIDAD

INMUNOLOGÍA 2010



INTRODUCCION

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 ESPECIFICAS

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.

ESTERILIZACION Y DESINFECCION

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 DESCONTAMINACION

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 al 0,5 g/100 mL de cloro activo:** Usar para superficies muy contaminadas (material de laboratorio). Dejar en contacto de 30-60 minutos.

PREPARACION: Para 2 L de solución utilizando lavandina de 80 g/L de cloro activo, colocar 200 mL de hipoclorito de sodio más agua corriente hasta completar 2 L de solución.

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

PREPARACION: 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 EXPOSICION: 30 a 60 minutos (no más).

• **Solución al 0,1 g/100 mL 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.

PREPARACION: Para 10 L de solución colocar 200 mL (aprox. un vaso de lavandina concentrada de 80 g/L de cloro activo) en balde limpio más agua corriente hasta completar 10 L de solución.

• **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.

PREPARACION: 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 EXPOSICION: 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.

PREPARACION: 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

RECOLECCION 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 DEBERA 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.) deberá ser colocado 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 INOCULACION ACCIDENTAL debido a pinchazos o cortes con agujas, pipetas, bisturís u otros agentes punzantes.
- EXPOSICION 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.
- EXPOSICION 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.

AEROSOLE:

- 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 fueren 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

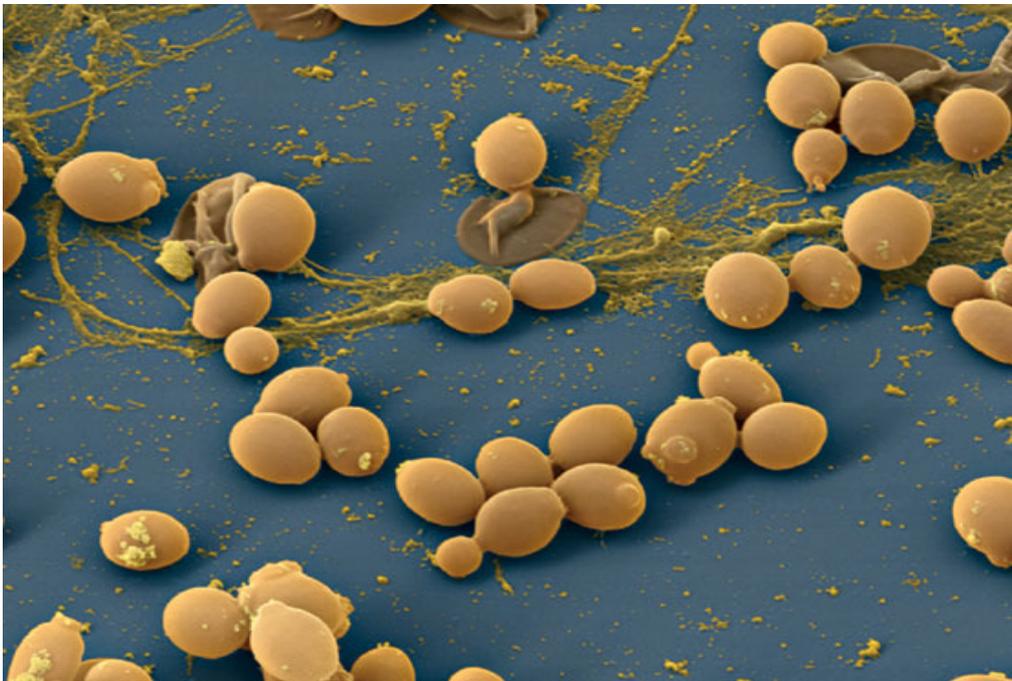
Recordemos que hace 300 años el médico medieval Bernardo Ramazzini escribía este párrafo:

"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?

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- Opsonización 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

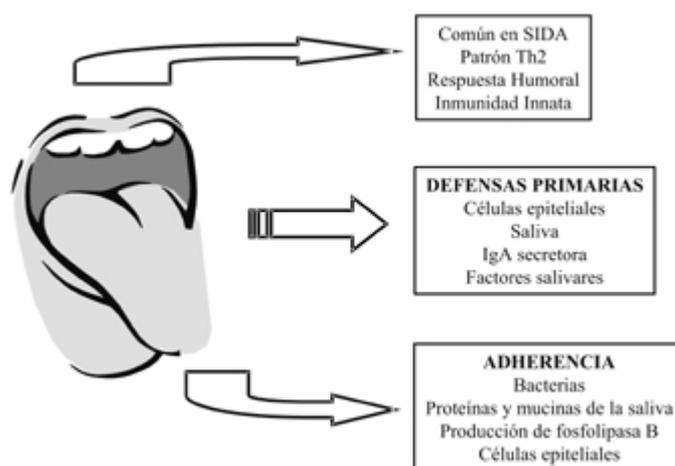
La candidiasis mucocutánea ha sido observada en personas con deficiencias fisiológicas de inmunidad celular. La candidiasis oral en el recién nacido o en la vejez puede estar relacionada con deficiencias del timo. La vulvovaginitis por *Cándida*, asociada con el embarazo o el uso de anticonceptivos, 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 gonadotropina 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 (folicúlos 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.

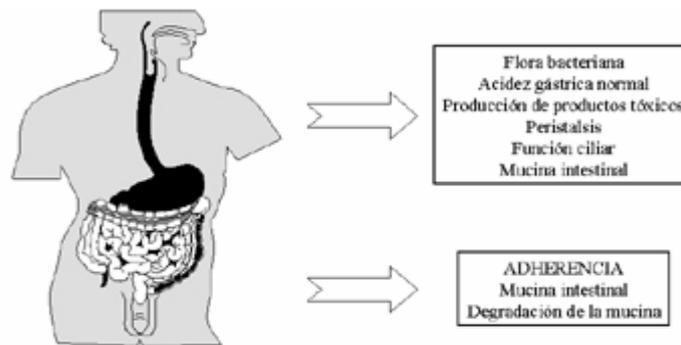
La función primaria del sistema inmunitario de las mucosas es proporcionar defensa al individuo en la superficie de las mucosas y la función secundaria, pero de igual importancia, es evitar la entrada de antígenos por esta vía y proteger así al sistema inmunitario sistémico de la inadecuada exposición 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

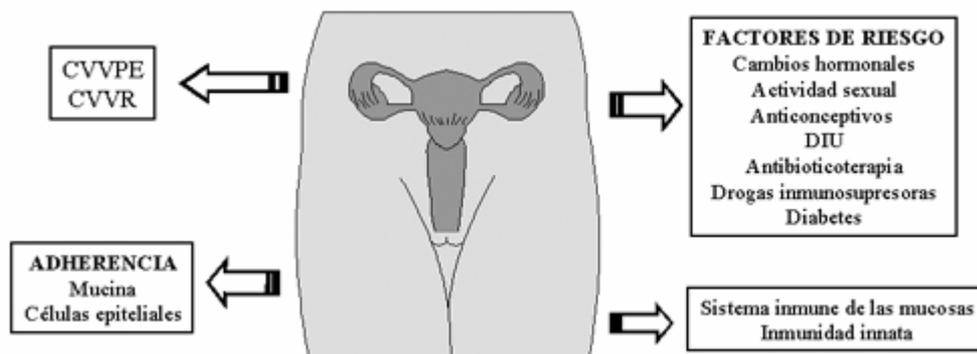
tiene cierto nivel de independencia inmunológica. Aunque la CVVR se presenta en ausencia de factores predisponentes conocidos, se ha postulado que es el resultado de alguna deficiencia o disfunción del sistema inmune, pero los resultados de las investigaciones indican que, de existir una deficiencia 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.



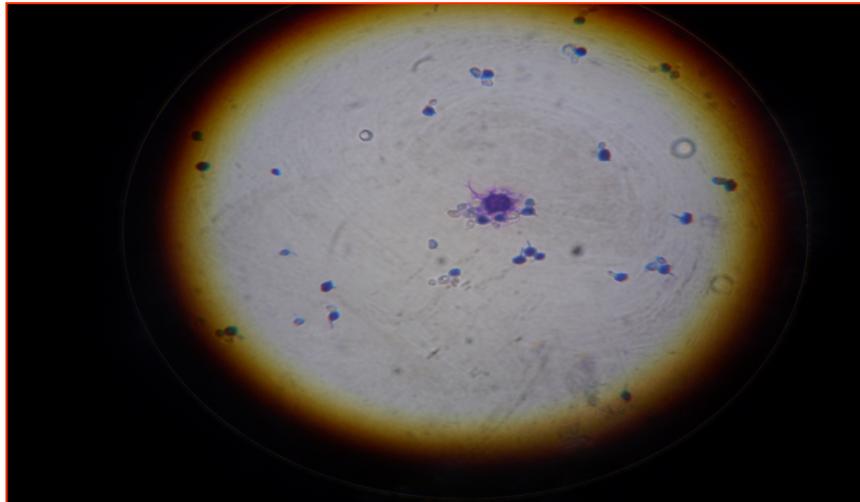
BIBLIOGRAFÍA

- 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

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's 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 Grunwald 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

DIEZ RAZONES PARA SOSPECHAR UNA INMUNODEFICIENCIA PRIMARIA



1. ocho o más infecciones al oído al año
2. dos o mas infecciones sinusales serias al año
3. dos o más meses con tratamiento antibiotico de poco efecto
4. dos o mas neumonias en un año
5. poco aumento de peso y crecimiento lento
6. formacion de abscesos en piel profunda u órganos
7. presencia de hongos en la boca (suciedad bucal) o en la piel en niños mayores de un año
8. necesidad de antibioticos intravenosos para superar infecciones
9. dos o más infecciones como meningitis, osteomielitis, celulitis o sepsis
10. una historia familiar de deficiencias inmunes primarias

CASO CLÍNICO N° 1

La paciente es producto del primer embarazo; gestación de 8 meses por infección urinaria y ruptura prematura de membranas; parto vaginal intervenido con forceps. Sin anoxia perinatal, examen físico neonatal normal; pesó 2900 g, Talla de 52 cm.

A los 20 días de vida consulta por primera vez debido a la presencia de una conjuntivitis bacteriana aguda severa y una dermatitis moderada con pústulas que comprometía el cuero cabelludo y el tronco.

Desde el segundo mes de vida es evaluada en el Servicio de Inmunología del Hospital Garrahn, Buenos Aires, debido a infecciones recurrentes de:

piel y anexos: dermatitis pruriginosa impetiginizada, forunculosis persistente, abscesos fríos, infecciones micóticas de piel y uñas, piodermatitis de cuero cabelludo;

ojos: conjuntivitis bacteriana aguda;

mucosas: candidiasis oral frecuente;

aparato respiratorio superior e inferior: otitis media supurada, bronconeumonía, múltiples neumonías supurativas desde los primeros meses de vida; estas infecciones fueron causadas por *S. aureus*, *S. pneumoniae* y *H. influenzae*.

Los episodios infecciosos mejoraban con el tratamiento antibiótico, pero presentaba rápidamente recaídas al discontinuar el tratamiento.

A los dos años sufrió una neumonía con empiema por *S. aureus*, después de la cual desarrolló bullas en el lóbulo superior del pulmón derecho.

A los cinco años padece un absceso en el lóbulo superior pulmonar derecho y como secuela desarrolla neumatoceles perennes.

A los 8 años se le practica una lobectomía superior derecha por un nuevo absceso pulmonar y un gran neumatocele persistente.

A los 16 años presenta un absceso del lóbulo medio pulmonar derecho; en el cultivo del esputo y en muestras del lavado broncoalveolar crecen abundantes *Aspergillus fumigatus* y flora mixta con predominio de *Proteus spp.* Es llevada a cirugía para practicar resección de dicho lóbulo; en el post-operatorio presenta un empiema derecho y fistula broncopleurales de alto débito. Recibió Itraconazol por 20 meses.

A los 18 años presenta abscesos mamarios recurrentes por *Morganella morganii* y una bronconeumonía por *Proteus mirabilis*.

A los 19 años padece de un cuadro de neumonía basal derecha; el examen de esputo reportó abundante *S. pneumoniae*.

a.

- b. Repase las distintas presentaciones clínicas del paciente a lo largo del tiempo así como las características de los microorganismos involucrados en cada una de ellas.
- c. Teniendo en cuenta los datos clínicos y de laboratorio, ¿Qué diagnóstico sospecharía?
- d. Indique el/los posible/s genotipo/s y fenotipo (manifestaciones clínicas e inmunológicas desencadenadas) que caracterizan a esta enfermedad.
- e. Haga un listado de los estudios de laboratorio que considera serian convenientes para llegar al diagnóstico.
- f. ¿Qué opciones de tratamiento existen actualmente para afrontar esta patología?

CASO CLÍNICO N° 2

Recién nacido masculino de 19 días de vida extrauterina referido al servicio de infectología pediátrica por un cuadro clínico de 15 días de evolución caracterizado por caída tardía del cordón umbilical, fiebre y lesiones dérmicas papuloeritematosas en el área periumbilical, hipogástrica, inguinal, glútea y en el muslo derecho, mismas que progresaron a celulitis y necrosis tisular. Ingresó al hospital con diagnóstico de septicemia secundaria a onfalitis. Hubo respuesta parcial al manejo inicial con antimicrobianos. Posteriormente tuvo infecciones bacterianas y micóticas recurrentes de las vías respiratorias y el tracto gastrointestinal. Tuvo retardo psicomotriz y deterioro severo de su estado nutricional. Falleció por septicemia a los cinco meses de edad.

- a) Defina septicemia y onfalitis. ¿Qué relación existe entre la onfalitis y la septicemia?
- b) Teniendo en cuenta los datos clínicos y de laboratorio, ¿Qué diagnóstico sospecharía?
- c) Haga un listado de los estudios de laboratorio que considera serian convenientes para llegar al diagnóstico. Explique las metodologías que utilizaría.
- d) Indique el/los posible/s genotipo/s y fenotipo (manifestaciones clínicas e inmunológicas desencadenadas) que caracterizan a esta enfermedad.

CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

1. ¿Qué son los PAMPs y cuáles considera de importancia en la Cándida?
2. ¿Qué son los PRRs y qué funciones cumplen?
3. ¿Qué PRRs considera de importancia en las células capaces de reconocer y eliminar a la Cándida?
4. ¿Qué es la endocitosis? ¿Cuáles son los distintos mecanismos de endocitosis?
5. ¿Qué mecanismos disponen los fagocitos para lisar los microorganismos?
6. ¿Qué son Cándidas opsonizadas y qué funciones cumple la opsonización?
7. La fagocitosis y lisis de Cándidas ¿varía según Ud utilice las levaduras vivas o muertas? Explique.
8. ¿Podría realizar el ensayo de laboratorio utilizando microorganismos diferentes a la Cándida? Mencione un ejemplo, así como los PAMPs y PRRs que estarían involucrados.
9. Investigue si es posible que la función fagocítica esté conservada mientras que fallen los mecanismos líticos. ¿Cómo podría evidenciarlo en el ensayo de laboratorio?
10. ¿Qué importancia tiene desde el punto de vista clínico la deficiencia en la fagocitosis y lisis de Cándidas?

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

- Estévez 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, Rodríguez 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° 3

SEPARACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS DE SUERO HUMANO



Currently we are the only known company with the capability to cost effectively supply immunoglobulin in enough quantities to justify mass production. Today, IRI Separation Technologies Inc. holds the enviable position of being the world's first, and only, commercial producer of pure antibody raw material for the human nutraceutical market.

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

Se trata de una paciente femenina de 23 años atendida en el Servicio de Ginecología y Obstetricia del Hospital LLano, sana, con historia de aborto incompleto que ameritó legrado uterino en octubre del año 2006 donde no se hizo determinación de grupo y Rh ni aplicación de inmunoprofilaxis.

La misma consulta en el mes de febrero del año 2007, con 17 semanas de gestación, por sangrado transvaginal. Ultrasonido obstétrico demostró desprendimiento placentario menor de 5%, por lo cual se manejó de manera ambulatoria.

En segunda cita de control el laboratorio revela Grupo O y Rh negativo. Al alcanzar la semana 29 de gestación la paciente consulta por contracciones uterinas y cólicos abdominales, derivándola al servicio de emergencia del hospital donde se inició esquema de maduración pulmonar para realizar inducción del parto, obteniéndose un producto masculino vivo pretérmino con una hemoglobina al nacer de 10 g y bilirrubina indirecta en 14 mg/dl.

- a) ¿Qué riesgos podría ocasionar el desconocimiento del grupo sanguíneo de la embarazada y del producto abortado?
- b) Teniendo en cuenta los antecedentes de la paciente, ¿qué sugeriría realizar al conocerse el grupo sanguíneo?
- c) ¿Qué ocurrió desde el punto de vista inmunopatológico?
- d) ¿A qué se refiere cuando comenta que no se realizó inmunoprofilaxis?

CASO CLÍNICO N° 2:



Una niña de 7 años acude al servicio de Emergencia del hospital con carácter urgente por presentar de manera brusca, dolor palpebral intenso y posterior hinchazón facial que le impedía la apertura espontánea del ojo derecho. Interrogando a la paciente, ésta comentó cómo había observado una araña de color marrón merodeando por su cama

después de notar un fuerte pinchazo palpebral. No presentaba antecedentes personales significativos y no tenía historia de alergias medicamentosas. No presentaba fiebre ni síntomas sistémicos sobreañadidos.

Ante este cuadro, se ingresó a la niña, se solicitó un TAC orbitario urgente, que no mostró patología orbitaria, y se comenzó un tratamiento con corticoides y antibióticos intravenosos.

Al día siguiente, había desaparecido gran parte del edema, pero sin embargo, apareció una placa violácea de aspecto necrótico en el párpado inferior del ojo derecho que se mantuvo a pesar de la resolución parcial del edema a las 48 horas.

- a) Qué importancia tiene el reconocimiento del arácnido causante de la picadura?
- b) Explique desde la inmunopatología qué eventos ocurrieron en el paciente en cuestión.
- c) ¿Por qué no se le administró antisuero específico? ¿sería necesario administrar alguna vacuna?
- d) Desde el punto de vista práctico, ¿qué estudios de laboratorio realizaría?

CASO CLÍNICO N° 3

Investigue acerca de los siguientes anticuerpos monoclonales, su obtención y utilidad clínica actual:

Abciximab

Anticuerpos monoclonales antiolesterol radiactivos

Adalimumab

Bevacizumab

Cetuximab

Conjugados de polímeros y fragmentos de anticuerpos

Efalizumab

Ibritumomab tiuxetan

Trastuzumab

CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

1. ¿Qué son las Inmunoglobulinas y qué son los Anticuerpos?
2. ¿Qué métodos pueden utilizarse para obtener Inmunoglobulinas purificadas?
3. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas de los métodos anteriores?
4. ¿Qué utilidad práctica tiene la obtención de Inmunoglobulinas purificadas?
5. ¿Cómo podría obtener anticuerpos monoclonales y policlonales?
6. Si quisiera obtener Inmunoglobulinas en gran escala para la preparación de antiseros terapéuticos, ¿qué método elegiría?
7. Si quisiera detectar IgA secretoria, ¿Cómo podría obtener un anticuerpo monoclonal para identificarla?

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° 4

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* (μg 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.

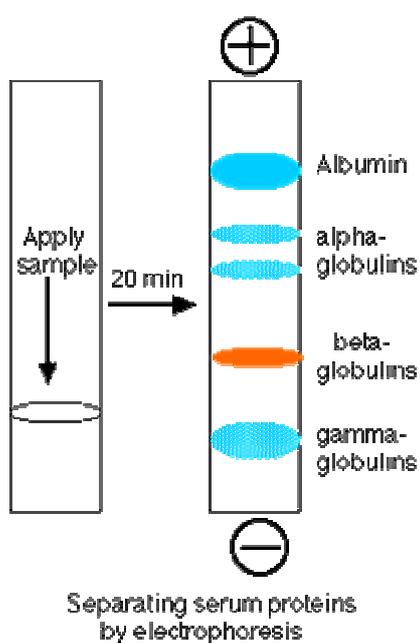
- Se observan fácilmente.
- No requieren equipos costosos.
- Pueden ser cuali o cuantitativas.
- Sin embargo una gran desventaja es su baja sensibilidad.

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.

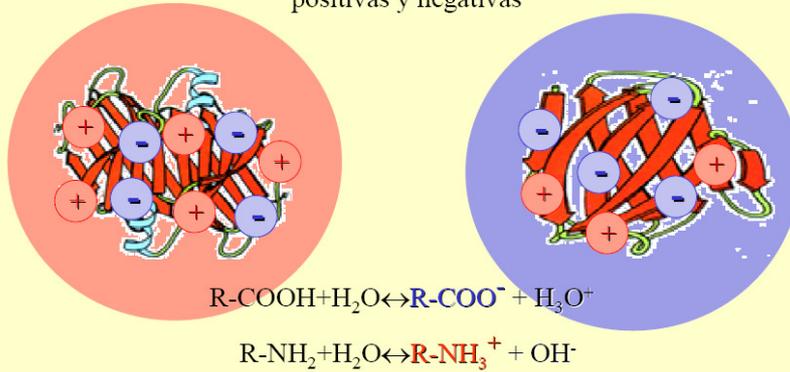
ELECTROFORESIS DE PROTEÍNAS SÉRICAS



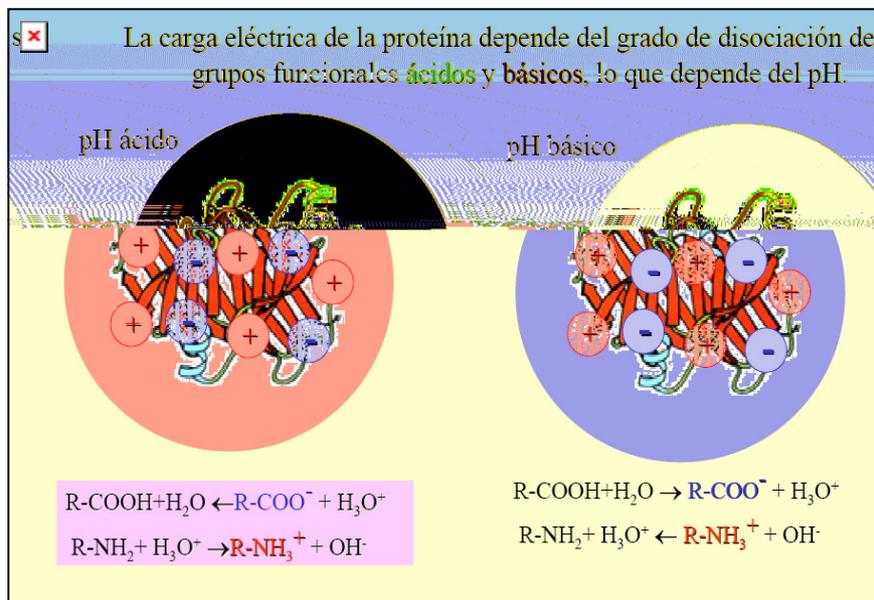
La electroforesis consiste en el movimiento de partículas cargadas por aplicación de un campo eléctrico externo. Este principio se aplica a la separación de las fracciones proteicas del suero.

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 $\text{pH} = 8.6$, 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



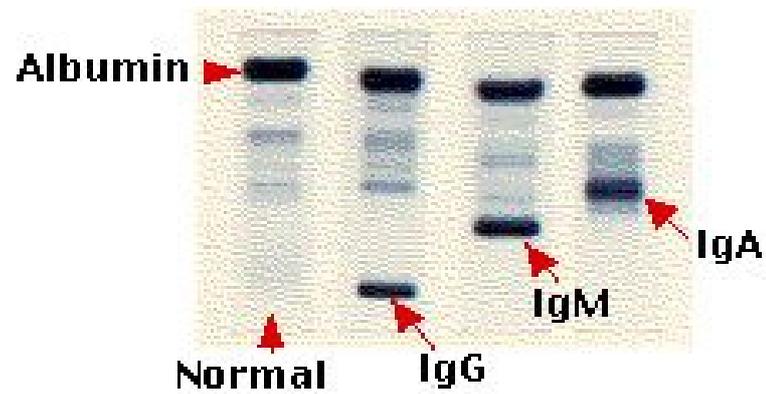
Esta separación se realiza sobre un soporte inerte que no impide ni estimula el flujo de las moléculas en el campo eléctrico. El soporte de acetato de celulosa separa al suero normal en cinco bandas proteicas: albúmina, alfa₁, alfa₂, beta y gama globulinas, donde cada una de estas fracciones electroforéticas 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)

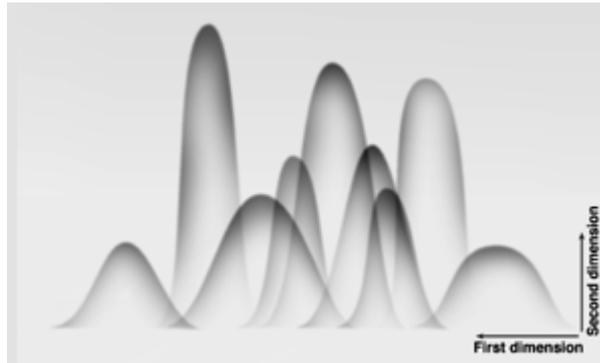
Aplicación: determinación de la concentración de inmunoglobulina en líquidos biológicos.

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

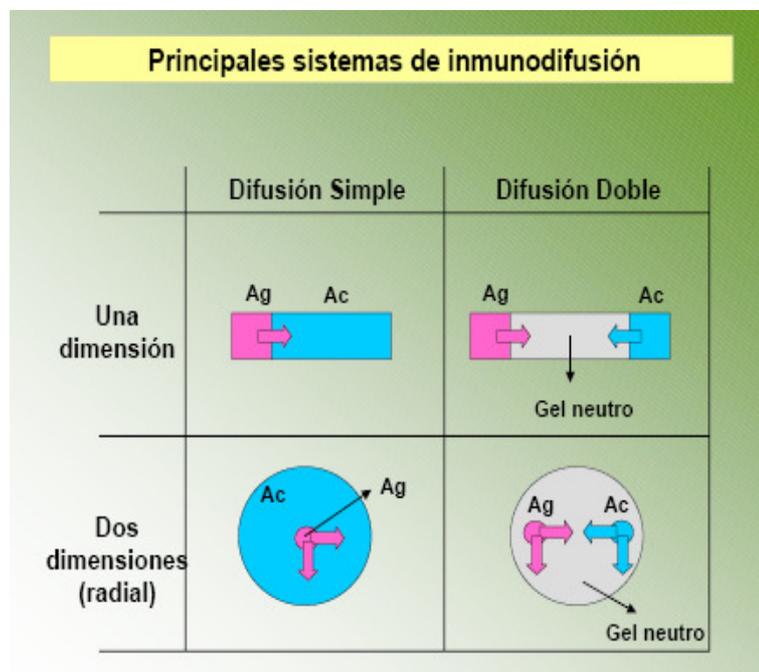
2) Electroinmunodifusión o “rocket” electroforesis.

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, basilica 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.

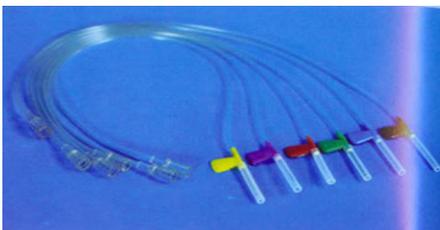
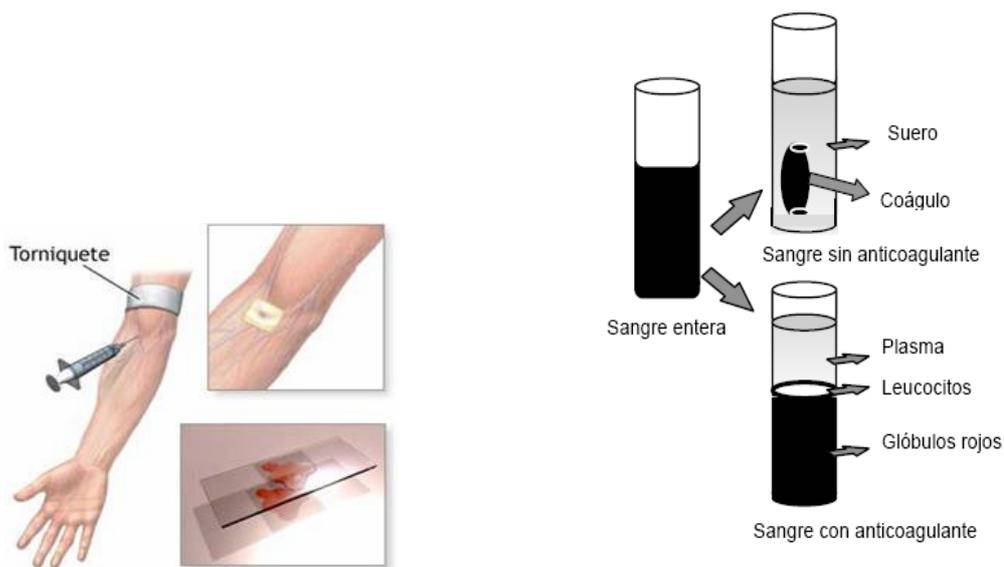
MATERIALES

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

TÉCNICA

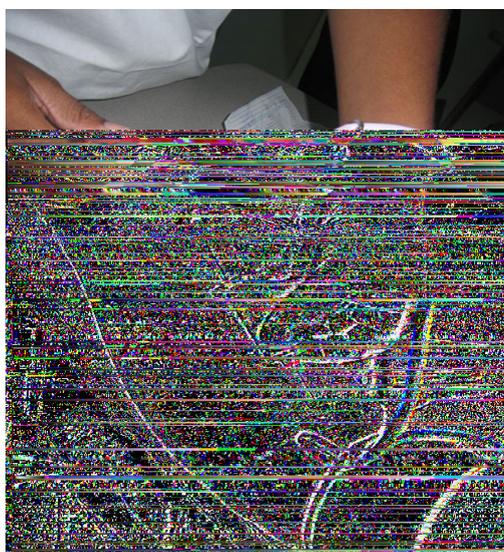
- Colocar al paciente en posición adecuada, tumbado o sentado, si está sentado la silla debe tener respaldo y brazo, y nunca se hará de pie.
- Se coloca el brazo extendido sobre el soporte o apoya brazo, sino disponemos de soporte se puede apoyar sobre una mesa.
- Colocar el torniquete de 8 a 10 cm por 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 DESPUES DE LA PUNCION

- 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 al 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 atraviesa 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 CLINICO

- 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
Puceau 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 icterico 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.

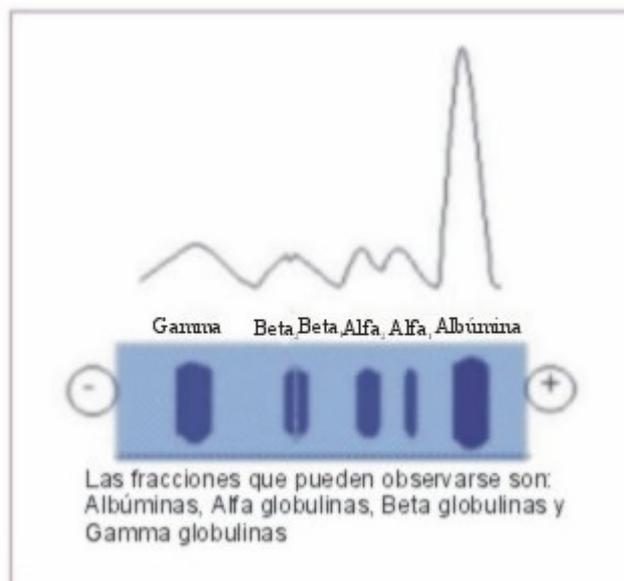
La determinación de proteínas totales es un examen que permite conocer la concentración de proteínas totales en el suero.

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 **proteínograma 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 glucometaloproteínas 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 estrógeno terapia (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. Estrógeno terapia (embarazo y anticoncepción)
Alfa 2 Macro Globulina	DISMINUYE en activación de proteasas, pancreatitis, y úlceras pépticas.	AUMENTA en estrógeno terapia, embarazo, defectos del tubo neural, diabetes, hepatitis, cirrosis, Síndrome de Down.

Antiestreptolisina 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 post-infección 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, enfermedad cardíaca prematura, falla renal crónica, dieta rica en grasas poliinsaturadas y hábito 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, enfermedad 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 (enfermedad de Wilson), malnutrición	AUMENTA en el embarazo (último trimestre duplica el valor) inflamación, malignidad y trauma.
Complemento C3	DISMINUYE en malnutrición proteica severa, enfermedades autoinmunes, artritis reumatoide, 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,	AUMENTA en reacciones de fase aguda y en ciertas enfermedades malignas

	quemaduras por calor.	
Fibrinógeno	DISMINUYE: Enfermedad hepática, hiperfibrinólisis, malignidad y afibrinogenemia	AUMENTA: en inflamación
Haptoglobina	DISMINUYE en anemias hemolíticas, enfermedad hepatoceleular crónica, reacciones transfusionales, malaria talasemia y homoglobiopatías	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 gammapatías Enfermedad crónica del hígado, infecciones, neoplasias del tracto gastrointestinal bajo, gammapatías monoclonales, mieloma a IgA y linfomas.
Inmunoglobulina E	DISMINUYE en algunos casos de neoplasmas avanzados, agammaglobulinemia e hipersensibilidad	AUMENTA en gammapatías policlonales, ciertas enfermedades alérgicas, asma fiebre del heno, gammopatías monoclonales, mieloma a IgE.
Inmunoglobulina G	DISMINUYE déficit de síntesis anticuerpos, corticoides, gammapatías no IgG.	AUMENTA en toda respuesta de anticuerpos. Mieloma IgG, hepatopatía crónica, infección crónica, colagenopatías.
Inmunoglobulina M	DISMINUYE Hipogammaglobulinemia congénita Waldeström, o adquirida, deficiencia selectiva de IgM o en gammapatías 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

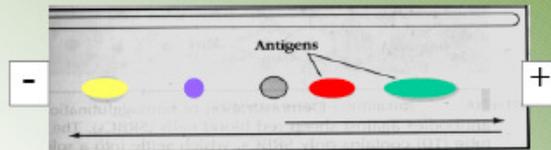
Grabar y Williams idearon un método analítico que permitía separar los componentes presentes en una muestra proteica, al que llamaron *análisis inmunolectroforético* y que resulta de gran valor para los exámenes inmunoserológicos e inmunoquímicos.

La inmunolectroforesis 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.

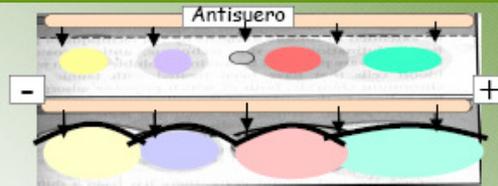


Consideraciones:

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

Paso 2: Inmunodifusión

Aprovechando la técnica de Ouchterlony se hace difundir lateralmente un antisuero específico para los constituyentes de la muestra en estudio y en las zonas correspondientes a la interacción Ag-Ac (zona de equivalencia) aparecerá una banda de precipitación.



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 15 μ l 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

Bisacrilamida 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

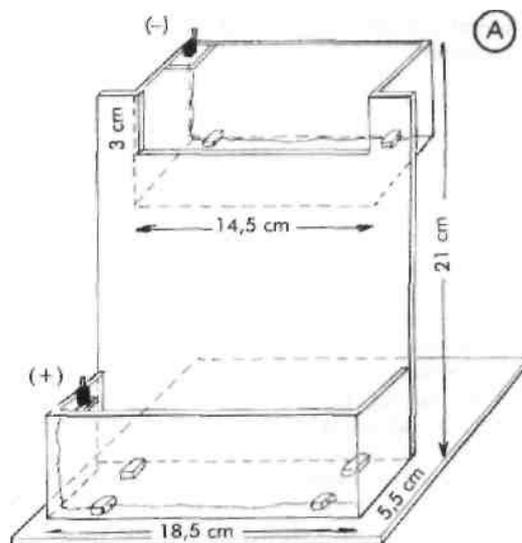
Preparación de la muestra

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 hirviente 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.

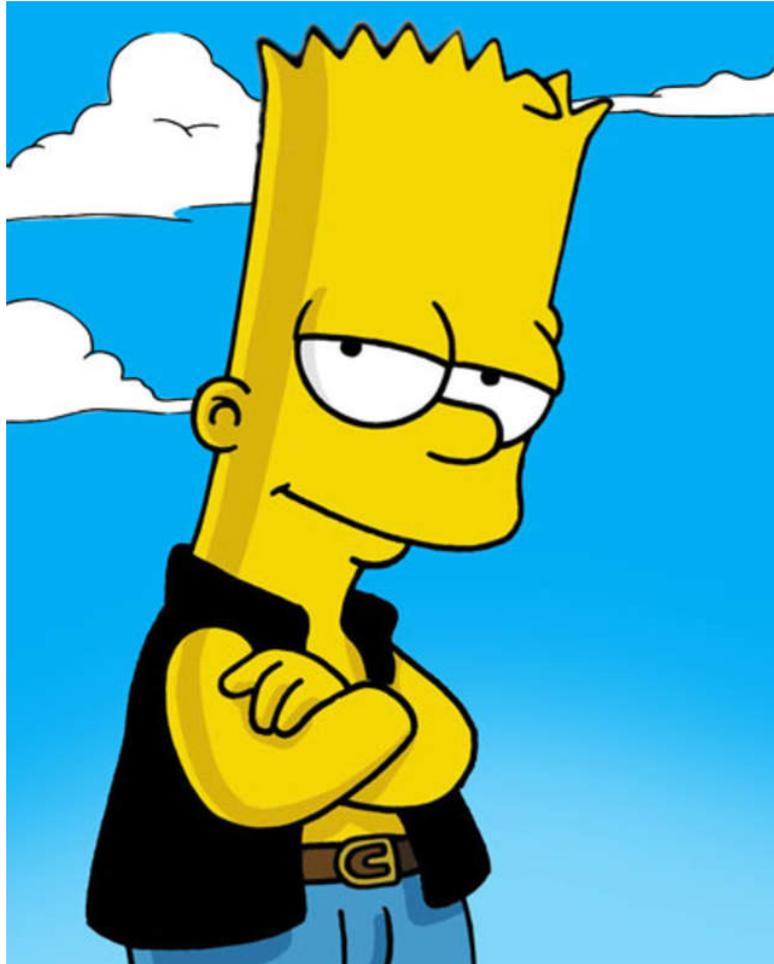
Nota: Se debe trabajar con guantes descartables para evitar impregnaciones exógenas del gel. Los recipientes a usar deben estar bien limpios y enjuagados con agua destilada.

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

Varón de 77 años fumador de 10 cigarrillos/día y con antecedentes de carcinoma en cuerda vocal izquierda que es remitido por su médico de familia para estudio al servicio de Medicina Interna por presentar desde hace seis meses astenia intensa, anorexia y dolores óseos generalizados en extremidades y parrillas costales que aumentan con el movimiento, presentando en la analítica un aumento de la velocidad de sedimentación (VSG).

En la exploración física la auscultación cardíaca es normal presentando roncus difusos en la auscultación pulmonar. En el abdomen no se palpa hepatoesplenomegalia. Las arterias temporales laten simétricas y no se aprecia focalidad neurológica. En la analítica de sangre presenta una hemoglobina de 13,9 g/dl, siendo el resto del hemograma normal. La VSG es de 118 mm/hora. Los parámetros de bioquímica clínica son normales.

La determinación de T4, TSH, PTH, vitamina B12 y ácido fólico presentaba valores normales, al igual que los marcadores tumorales (CEA, PSA y α FP).

Se realizó una serie ósea radiológica mostrando múltiples imágenes líticas a nivel del cráneo, huesos largos, costillas y clavículas.

Se realizó una biopsia de médula ósea en la que se apreciaban acúmulos de células linfoides y amplios grumos, correspondientes a infiltración en sábana por elementos plasmocitoides bien diferenciados.

- a) ¿Qué estudios de laboratorio realizaría al paciente teniendo en cuenta los datos clínicos? Justifique cada determinación y el método utilizado para realizarla.
- b) Diferencie entre gammapatía monoclonal, oligoclonal y policlonal. Ejemplifique situaciones clínicas donde observe cada uno de los patrones mencionados.
- c) ¿Qué importancia tiene realizar el estudio de médula ósea?
- d) Mencione los esquemas de tratamiento actuales y explique cómo actúa cada una de las drogas utilizadas.

CASO CLÍNICO N° 2

Escolar de 11 años, sexo femenino, con diagnóstico realizado a la edad de 1 año y 8 meses de SN cortico-resistente (biopsia compatible con glomérulo-esclerosis focal y segmentaria) en tratamiento con ciclosporina, actualmente en recaída. Consultó por diplopía, oliguria y edema generalizado. Se realizó una angio-RM cerebral, mostrando trombosis de los senos longitudinal superior y lateral izquierdo. El perfil de

coagulación presentó función de antitrombina III disminuida (53%), con función de proteínas C y S dentro de límites normales, mutación de factor V Leiden (-), mutación de protrombina G20210A (-), anticoagulante lúpico (-) y anticuerpos anticardiolipinas (-). Se inició tratamiento con ciclosporina y enoxiparina (heparina de bajo peso molecular), seguida de cumarínicos. Fue dada de alta a las tres semanas con función renal normal, regresión total de la diplopía e imágenes cerebrales normales.

- a) ¿Cómo esperaría encontrar el proteinograma electroforético en el SN? ¿Cree Ud que la patente electroforética cambia con el tratamiento?
- b) ¿Qué diferencia existe entre SN cortico-sensible y cortico-resistente?
- c) ¿Qué es la ciclosporina y cómo actúa?
- d) ¿Qué diferencia existe entre enoxiparina y cumarínicos?
- e) ¿Qué relación existe entre SN y trastornos de la coagulación? Justifique los estudios solicitados.

CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

1. Cuáles son las uniones que intervienen en una interacción Ag-Ac? Reflexione acerca de las posibles ventajas de estas uniones comparadas con otras interacciones químicas.
2. Defina y ejemplifique los conceptos de especificidad, afinidad y avidéz.
3. ¿Conoce alguna reacción de precipitación en medio líquido que detecte una interacción Ag-Ac (cualitativa)? ¿A qué se debe la visualización de esta reacción? ¿Cuáles son las condiciones que deben cumplir el Ag y el Ac?
4. ¿Cómo efectuaría una reacción de precipitación cuantitativa en medio líquido? ¿En que unidades expresaría el resultado? ¿Podría por este método discriminar el isotipo al cual pertenecen los anticuerpos reaccionantes?
5. ¿En qué casos usaría una reacción de inhibición de la precipitación?
6. Diagrame una reacción de inhibición de la precipitación para un anticuerpo anti-hapteno. ¿Podría efectuar esta reacción de inhibición utilizando un Ag convencional?
7. Un Anticuerpo monoclonal, ¿es siempre monoespecífico?
8. Indique las diferencias y semejanzas de la precipitación en medio gelosado y en medio líquido.

9. ¿Cuáles son las leyes físicas que rigen la difusión de las macromoléculas? ¿Cuáles son los factores que influyen en la aparición de las bandas de precipitación?
10. ¿Qué tipos de bandas de precipitación pueden definirse en la técnica Ouchterlony? Dé ejemplos de cada una de ellas.
11. ¿Cuál es la utilidad práctica de la técnica de Ouchterlony? ¿Es una técnica cuali o cuantitativa? ¿Sirve para resolver muestras simples y/o complejas?
12. ¿Puede decirse que dos antígenos que presentan bandas de identidad son realmente idénticos? ¿Por qué?
13. ¿En qué consiste la inmunodifusión radial? Fundamento de las técnicas de Fahey y Mancini. Mencionar las causas más frecuentes de error en cada metodología.
14. Concepto de monoespecificidad. ¿Cómo se obtienen los sueros monoespecíficos?
15. ¿Cuáles son las bases de las técnicas electroforéticas?
16. ¿Qué técnicas electroforéticas conoce? Realice un cuadro mencionando las características más importantes de cada una de ellas incluyendo la utilidad clínica.
17. ¿Para qué le sirve realizar el proteinograma electroforético en una rutina de laboratorio?
18. ¿Por qué debe elegir adecuadamente el sistema antígeno – anticuerpo si desea realizar una CIE?
19. Las bandas de precipitación en una IEF tienen características propias. ¿Cuáles son los factores responsables de ello? ¿Reemplazaría la IEF por la Inmunofijación? Fundamente su elección.
20. Si le interesa conocer el isotipo de cadena liviana presente en una muestra sérica y urinaria ¿Qué metodología elegiría? Fundamente la elección. ¿y si le interesara conocer el isotipo de cadena pesada?
21. ¿Qué técnica elegiría si deseara cuantificar la concentración de una inmunoglobulina sérica? ¿podría cuantificar inmunoglobulinas en orina?
22. ¿Cuáles de las técnicas de precipitación en medio gelosado son cualitativas y cuáles cuantitativas?
23. ¿Cuáles de las técnicas de precipitación en medio gelosado utilizaría para determinar la pureza de un Ag?

INFORME

- ❖ Mencionar diferentes metodologías utilizadas para la separación de proteínas séricas. Seleccione aquellas que Ud considere de 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.

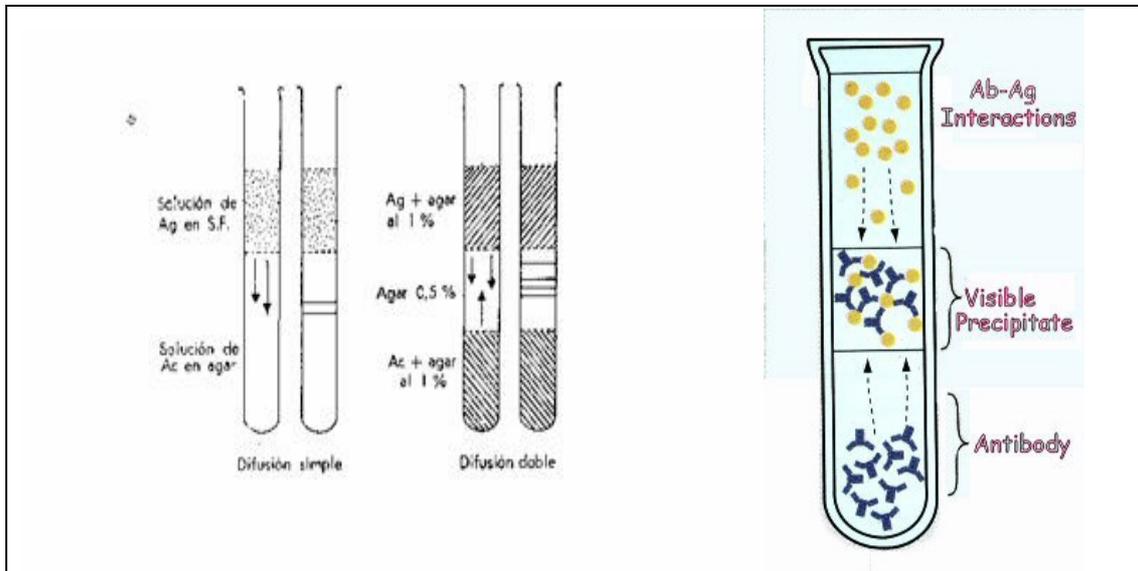
MATERIALES Y MÉTODO

- 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

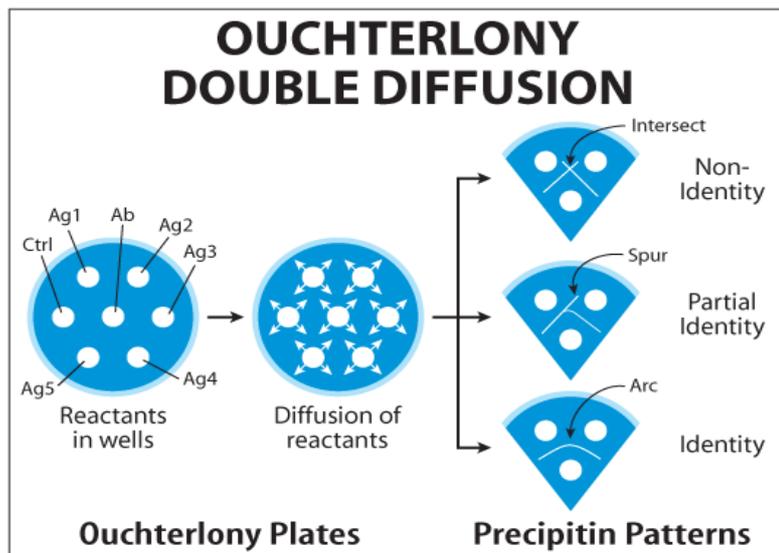
- Agar purificado al 1.5% P/V, en solución de cloruro de sodio 0.15M y 0.01% de mertiolate o agarosa al 0.8%
- Sueros precipitantes.
- Soluciones de antígeno a estudiar.
- Placas de Petri o portaojetos.
- Pipetas de 1ml y 10ml.

- 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 µl, 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 µl de diluciones apropiadas de la solución patrón (pura, 1/2, 1/4)
- f) En los reservorios restantes colocar 5 µl 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:

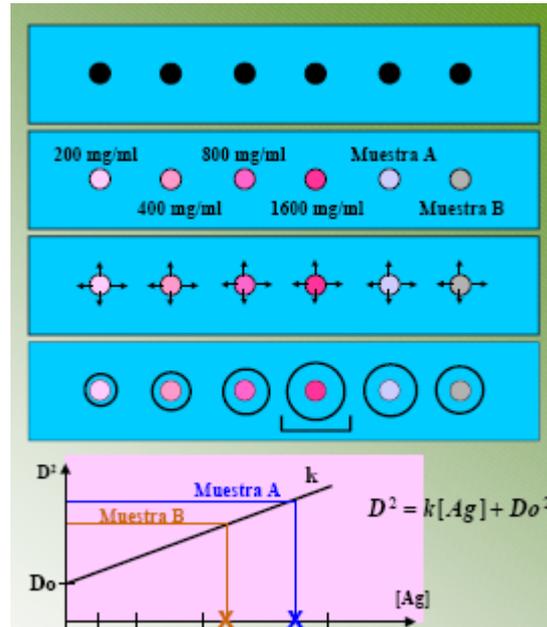
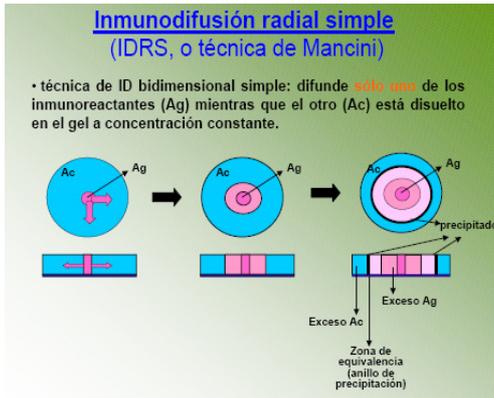
$$D^2 = D_o^2 + k [Ag]$$

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

D_o = 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.

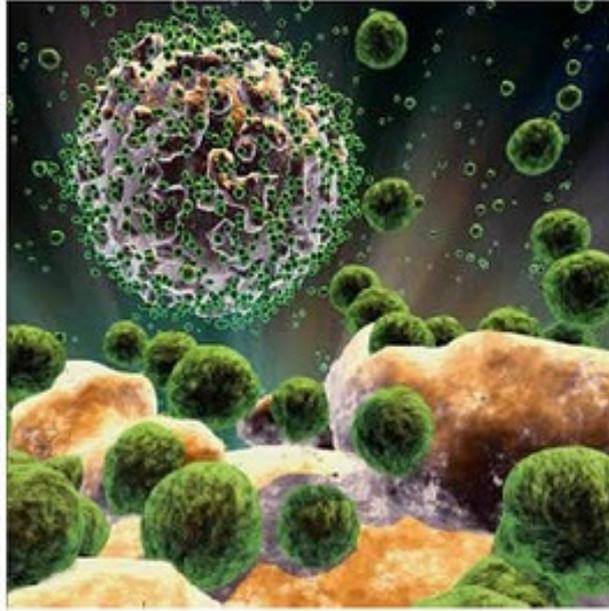
$[Ag]$ = abscisa de la curva.



CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

24. Cuáles son las uniones que intervienen en una interacción Ag-Ac? Reflexione acerca de las posibles ventajas de estas uniones comparadas con otras interacciones químicas.
25. Defina y ejemplifique los conceptos de especificidad, afinidad y avidéz.
26. ¿Conoce alguna reacción de precipitación en medio líquido que detecte una interacción Ag-Ac (cualitativa)? ¿A qué se debe la visualización de esta reacción? ¿Cuáles son las condiciones que deben cumplir el Ag y el Ac?
27. ¿Cómo efectuaría una reacción de precipitación cuantitativa en medio líquido? ¿En que unidades expresaría el resultado? ¿Podría por este método discriminar el isotipo al cual pertenecen los anticuerpos reaccionantes?
28. ¿En qué casos usaría una reacción de inhibición de la precipitación?
29. Diagrame una reacción de inhibición de la precipitación para un anticuerpo anti-hapteno. ¿Podría efectuar esta reacción de inhibición utilizando un Ag convencional?
30. Un Anticuerpo monoclonal, ¿es siempre monoespecífico?
31. Indique las diferencias y semejanzas de la precipitación en medio gelosado y en medio líquido.
32. ¿Cuáles son las leyes físicas que rigen la difusión de las macromoléculas? ¿Cuáles son los factores que influyen en la aparición de las bandas de precipitación?
33. ¿Qué tipos de bandas de precipitación pueden definirse en la técnica Ouchterlony? Dé ejemplos de cada una de ellas.
34. ¿Cuál es la utilidad práctica de la técnica de Ouchterlony? ¿Es una técnica cuali o cuantitativa? ¿Sirve para resolver muestras simples y/o complejas?
35. ¿Puede decirse que dos antígenos que presentan bandas de identidad son realmente idénticos? ¿Por qué?
36. ¿En qué consiste la inmunodifusión radial? Fundamento de las técnicas de Fahey y Mancini. Mencionar las causas más frecuentes de error en cada metodología.
37. Concepto de monoespecificidad. ¿Cómo se obtienen los sueros monoespecíficos?
38. ¿Cuáles son las bases de las técnicas electroforéticas?
39. ¿Qué técnicas electroforéticas conoce? Realice un cuadro mencionando las características más importantes de cada una de ellas incluyendo la utilidad clínica.
40. ¿Para qué le sirve realizar el proteinograma electroforético en una rutina de laboratorio?

41. ¿Por qué debe elegir adecuadamente el sistema antígeno – anticuerpo si desea realizar una CIE?
42. Las bandas de precipitación en una IEF tienen características propias. ¿Cuáles son los factores responsables de ello? ¿Reemplazaría la IEF por la Inmunofijación? Fundamente su elección.
43. Si le interesa conocer el isotipo de cadena liviana presente en una muestra sérica y urinaria ¿Qué metodología elegiría? Fundamente la elección. ¿y si le interesara conocer el isotipo de cadena pesada?
44. ¿Qué técnica elegiría si deseara cuantificar la concentración de una inmunoglobulina sérica? ¿podría cuantificar inmunoglobulinas en orina?
45. ¿Cuáles de las técnicas de precipitación en medio gelosado son cualitativas y cuáles cuantitativas?
46. ¿Cuáles de las técnicas de precipitación en medio gelosado utilizaría para determinar la pureza de un Ag?



CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

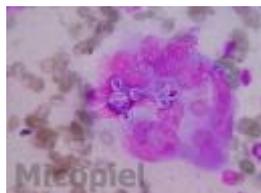
Se trata de paciente masculino de 52 años de edad, natural y procedente de Guacara, Estado Carabobo, quien consultó por presentar dermatosis localizada en borde lateral izquierdo en tercio medio de tórax, caracterizada por placa ulcerada de 12 x 5 cm, bordes definidos, elevados, eritematoso con descamación melicérica de 9 meses de evolución. En el resto del examen físico sin alteraciones.



Antecedentes personales: Tratado por tuberculosis pulmonar no bacilífera durante 6 meses. Profesión agricultor.

Impresión diagnóstica: Leishmaniasis cutánea localizada, esporotricosis, cromoblastomycosis, tuberculosis cutánea.

Frotis por raspronta (Giemsa): Se observaron abundantes levaduras multigemantes, no se observaron formas amastigotas de Leishmania.



Estudio micológico (úlceras y esputo): Directo KOH 20% y tinta Parker® azul se observaron abundantes blastoconidias multigemantes. Cultivo en agar Sabouraud con Cloranfenicol y Mycosel®, a los 15 días de incubación a temperatura ambiente crecimiento de colonias algodonosas blancas y cerebriformes claras sin pigmento en el anverso y a 37°C colonias blanquecinas, cerebriformes muy plegadas.

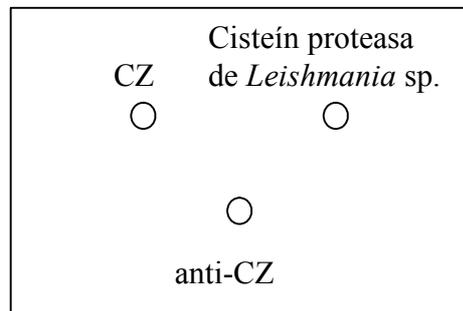
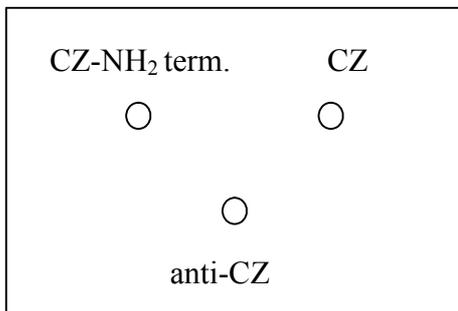
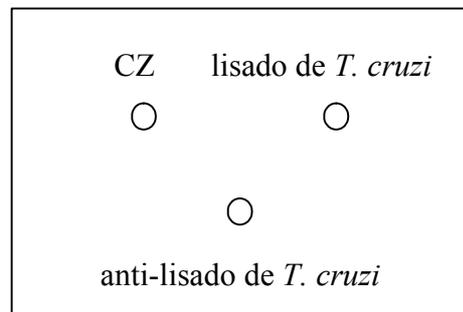
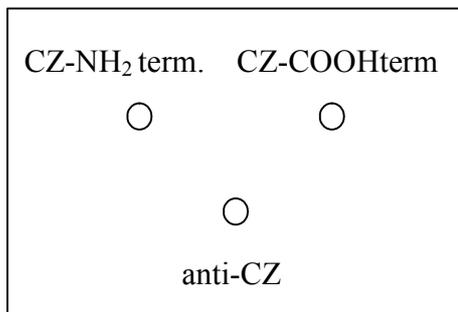
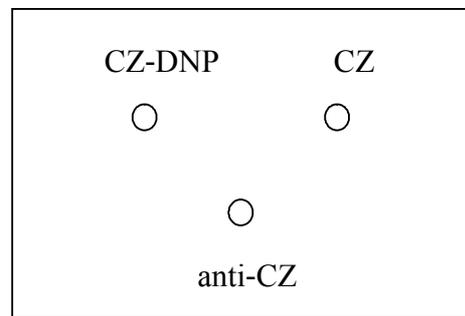
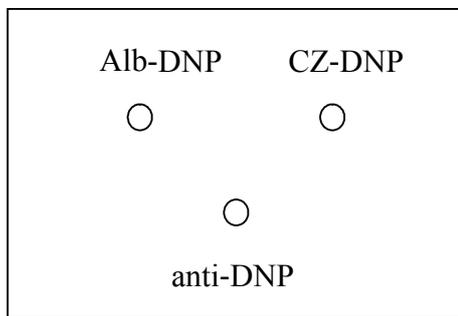
Estudio inmunológico: Paracoccidioidina 15 mm (lectura a las 48 horas), Leishmanina y esporotriquina 0 mm (lectura a las 48 horas), PPD 0 mm (lectura a las 72 horas). Inmunodifusión doble contributorio para Paracoccidioides brasiliensis (título 1:16).

- Investigue acerca de los posibles diagnósticos en este paciente (ver impresión diagnóstica).
- ¿Cómo realizaría la prueba de Inmunodifusión doble? Esquematice.
- ¿Qué demuestra con la prueba cutánea? Justifique.

CADO CLÍNICO N° 2

Trypanosoma cruzi, agente etiológico de la enfermedad de Chagas, posee una cistein proteasa mayoritaria, llamada cruzipaina (cz). Dicha enzima posee dos dominios: el NH₂ terminal (CZ-NH₂term.), el cual posee actividad catalítica y el COOH (CZ-COOHterm.) que no posee función enzimática. El dominio catalítico posee una muy alta homología con la cistein proteasa de *Leishmania* spp., agente etiológico de la leishmaniasis.

Complete en los siguientes esquemas las bandas de precipitación que aparecerían en cada caso.



INFORME

- Utilizando un sistema de lectura apropiado, leer el diámetro de los halos de precipitación y determinar 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

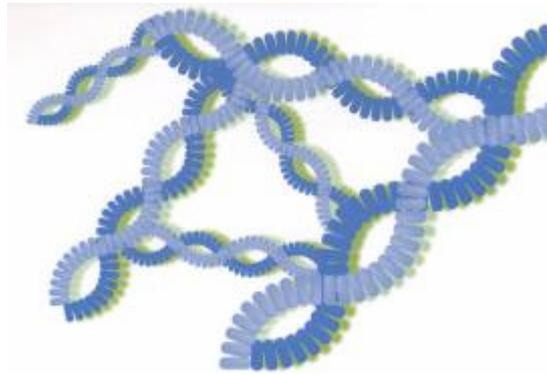
BIBLIOGRAFÍA

- 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 5

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

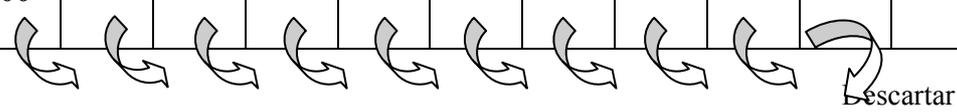
Las isohemaglutininas antiA y anti-B son anticuerpos naturales dirigidos contra los polisacáridos del glóbulo rojo. Están presentes normalmente en el primer año de vida y sus títulos son superiores a 1/8; su determinación tiene importancia en las **inmunodeficiencias de anticuerpos**.

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.

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.

GRUPO SANGUÍNEO Y FACTOR RH

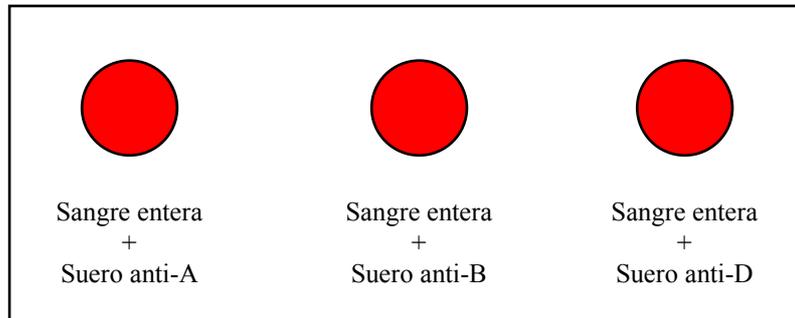
OBJETIVO: Tipificación de grupos sanguíneos en muestras de sangre humana.

REACTIVOS Y MATERIALES:

- Sangre entera humana anticoagulada.
- Suero anti-A, suero anti-B y suero anti-D.
- Portaobjetos.

PROCEDIMIENTO:

- 1 – Limpiar los porta objetos con alcohol 70% y dejar secar.
- 2 – Colocar una gota de sangre entera.
- 3 – Colocar una gota de anti-suero.
- 4 – Rotar (despacio) el portaobjetos.
- 5 – Observar.



DETECCION DE ANTIGENOS FEBRILES (SALMONELLA Y BRUCELLA)

INTRODUCCION:

Las Salmonellas se consideran patógenos entéricos obligados. Los alimentos y el agua contaminados son los mecanismos de transmisión. La enfermedad puede presentarse como gastroenteritis, septicemia con lesiones en diversos órganos o fiebre tifoidea.

La Brucelosis se presenta en la mayoría de los casos con anorexia, fiebre, decaimiento y escalofríos, pudiendo aparecer luego complicaciones importantes como son las óseas y neuropsíquicas. A pesar de que el método definitivo para establecer la etiología de estas enfermedades es a través del aislamiento del agente patógeno, esto resulta difícil debido a que la investigación se realiza frecuentemente en períodos tardíos de la enfermedad y luego de una terapia antibiótica. Por este motivo es de gran importancia diagnóstica la detección de los anticuerpos específicos producidos en el curso de cada una de estas patologías. Una prueba aislada es de escaso valor, siendo necesarias 2 o más pruebas seriadas a fin de poner en evidencia cambios en el título de anticuerpos

PROCEDIMIENTO

- 1) Dividir una placa de vidrio en sectores de 4 cm² aproximadamente.
- 2) Empleando las micropipetas apropiadas colocar en estos sectores 80 µl, 40 µl, 20 µl, 10 µl y 5 µl de suero límpido. Repetir el procedimiento para un control negativo y uno positivo.
- 3) Colocar 1 gota de Antígeno previamente agitado sobre cada gota de suero.
- 4) Mezclar el suero y el Antígeno utilizando una varilla abarcando un área de 2 cm de diámetro aproximadamente. Debe emplearse una varilla distinta para cada dilución de suero o la misma varilla mezclando a partir de la muestra más diluida.
- 5) Agitar la placa durante 2 minutos en forma circular.
- 6) Observar la aglutinación utilizando luz indirecta sobre fondo oscuro y con aumento de 100x (objetivo 10x).

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Negativo: no aparece aglutinación.

Positivo: se observa aglutinación.

Título: se considerará la última dilución donde se observe aglutinación visible (observación microscópica con aumento de 10x).

VDRL / USR (Unheated Serum Reagins)

INTRODUCCION

La sífilis es una enfermedad venérea causada por el *Treponema pallidum*, que invade las mucosas intactas o la piel en áreas de abrasiones. El contacto sexual es la forma más común de transmisión. La detección y tratamiento de la enfermedad en sus estadios tempranos es fundamental a fin de evitar complicaciones graves como sífilis cardiovascular, neurosífilis y sífilis congénita. El diagnóstico de esta enfermedad sufre la carencia de un método para cultivar el microorganismo en medios de laboratorio y la dificultad para detectarlo en estadios de la enfermedad en los que no se observan lesiones epidérmicas. Sin embargo, desde el comienzo de la infección aparecen en el suero del individuo infectado ciertas sustancias denominadas "reaginas", que reaccionan con antígenos de cardiolipina, lecitina y colesterol. Estas reaginas junto a los signos clínicos son por lo tanto los procedimientos más rápidos y útiles disponibles para diagnóstico de sífilis.

PROCEDIMIENTO

Muestra: suero.

Colocar en cada uno de los sectores delimitados de la placa 50 ul de muestra y 50ul de una dilución 1:16 de la muestra. Con gotero provisto colocar 1 gota del antígeno (suspensión acuosa de antígeno de cardiolipina y lecitina purificados, en buffer fosfatos con cloruro de colina y EDTA de acuerdo a las indicaciones de la O.M.S).

Agitar horizontalmente la placa a 180 rpm durante 4 minutos. Observar inmediatamente en microscopio con poco aumento (60 a 100x).

Si resulta reactivo: Preparar en la placa diluciones de la muestra 1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32 con solución fisiológica y realizar para cada dilución la prueba como se describe en el ítem anterior.

Muestra: LCR

Sensibilización del antígeno: partes iguales de antígeno convencional y solución salina al 10%. Dejar reposar al menos 10' antes de utilizar.

Procedimiento: idem a la determinación en suero pero con una rotación de 7'.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Reactivo: presencia de floculación.

No reactivo: ausencia completa de floculación.

Prueba semicuantitativa: el título estará dado por la inversa de la última dilución que se observe reactiva.

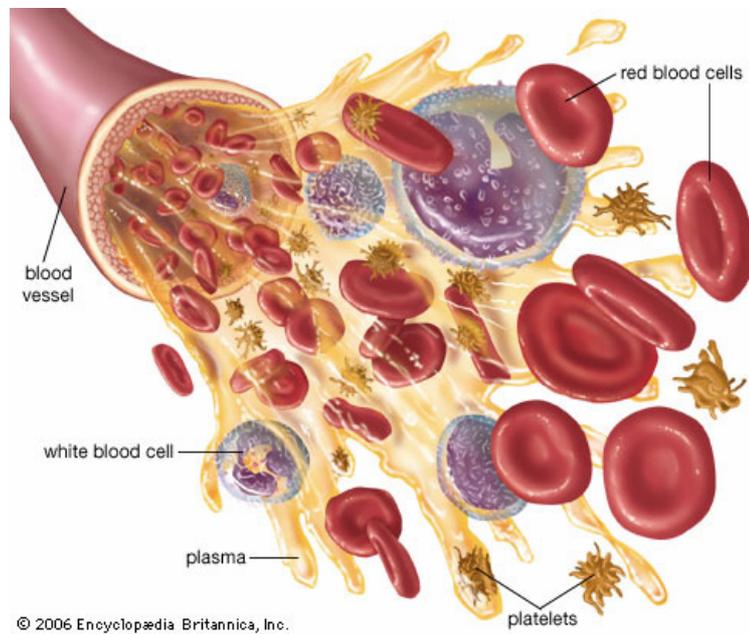
OTRAS TÉCNICAS DE AGLUTINACIÓN INDIRECTA

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.**



© 2006 Encyclopædia Britannica, Inc.

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

Paciente de 9 meses de edad que consulta por historia de fiebre de 10 días, con alzas térmicas diarias hasta 40 °C y compromiso del estado general. Al décimo día se agregó artritis del tobillo izquierdo, con limitación funcional de esta articulación. Se efectuaron **artrotomía** del tobillo izquierdo, **toilette quirúrgico** y **osteotomía** del peroné.

Se encontró escasa cantidad de líquido sinovial. Se trató con cloxacilina y gentamicina e.v. y persistió febril, con alzas térmicas vespertinas hasta 39,5 °C, compromiso del estado general y anemia progresiva. Una semana después de la cirugía se agregó exantema cutáneo máculo eritematoso solevantado en tronco y extremidades y poliadenopatías generalizadas. Se cambió tratamiento antibiótico a clindamicina y ceftriaxona e.v., sin respuesta. Con el diagnóstico de ARJS se suspendió el tratamiento y se inició ibuprofeno 10 g/kg cada ocho hrs. Se observó mejoría del estado general y declinación de la curva térmica. Se adicionó edema de manos, artritis de IF del dedo pulgar derecho y de la rodilla izquierda. Se agregó prednisona y aparece la mejoría franca.

- a. ¿Qué es la ARJ? ¿en qué se diferencia de la AR del adulto?
- b. ¿Qué mecanismos inmunológicos están involucrados?
- c. Mencione qué métodos elegiría para realizar y qué resultados esperaría obtener:
 - a) Eritrosedimentación, PCR, AR, Rose Ragan.
 - b) Proteinograma electroforético y Dosaje cuantitativo de Igs.
- d. ¿Sugeriría otros estudios? Mencione.
- e. ¿Por qué cree que se administraron antibióticos? ¿Qué acción tienen los utilizados?
- f. ¿Qué opciones terapéuticas existen hoy día, teniendo en cuenta la existencia en el mercado de anticuerpos monoclonales?

CASO CLÍNICO N° 2

Paciente varón de 27 años, fumador, sin otros antecedentes personales ni familiares de interés. Consulta por la aparición espontánea de hematomas en cara anterior de ambas piernas de dos semanas de evolución, sin astenia, fiebre, hemorragias de otra localización ni otros síntomas acompañantes.

En la exploración física se apreciaba la presencia de múltiples hematomas bilaterales en región tibial anterior, de aproximadamente 3cm de diámetro, así como una discreta palidez cutáneomucosa. No se palpaban adenopatías ni hepatoesplenomegalia y el

resto de la exploración era normal. Se solicitó laboratorio urgente en la que destacaban:

Hb: 7,50 g/dl, VCM: 98,60FL; Plaquetas, 20.000 /mm³, VSG: 64 mm/h y LDH: 653 U/l (V.N.: 230 – 460 U/L a 37°C); la serie blanca, el estudio de coagulación y el resto de parámetros eran normales.

- a. ¿Qué importancia tiene realizar una anamnesis adecuada?
- b. ¿Por qué podrían aparecer los hematomas? ¿Cómo piensa se generan?
- c. Si tuviera que realizar la reacción de Coombs, ¿Cuál elegiría? Justifique.
- d. ¿Qué otros estudios de laboratorio realizaría? ¿considera importante algún estudio genético?

CUESTIONARIO DE ORIENTACION

1. ¿Cuáles son las diferencias y semejanzas entre aglutinación, floculación y precipitación? ¿Tienen igual sensibilidad?
2. ¿Qué es el fenómeno de prozona y cuáles pueden ser las causas que lo expliquen?
3. Compare las variantes metodológicas de aglutinación en tubo, placa plana y microplaca. Ventajas y desventaja de cada una.
4. Enumere aplicaciones concretas de la aglutinación directa.
5. ¿Qué es la hemoaglutinación pasiva o indirecta?
6. ¿Qué tipo de soportes pueden usarse? ¿Qué tipo de glóbulos rojos utilizaría? Si utilizara glóbulos rojos ¿cómo los sensibilizaría? ¿Por qué debe incluir glóbulos rojos no sensibilizados? Mencione ejemplos donde utilice distintos soportes del antígeno.
7. ¿Qué son los anticuerpos incompletos, heterófilos y asimétricos? ¿Cómo podría evaluar cada uno de ellos?
8. ¿Qué es la isosensibilización por Rh? ¿Cómo puede producirse?
9. Fundamento de la reacción de Coombs o anti-gammaglobulina. Describa los distintos tipos de suero de Coombs que pueden utilizarse. Indique cómo los obtiene experimentalmente y qué tratamientos previos a su uso debe realizar.
10. Explique la reacción de Coombs directa e indirecta. ¿Cuáles son las aplicaciones de cada una? ¿Cuál es la muestra clínica de elección en cada caso? ¿Qué controles agregaría al protocolo de reacción?

INFORME

1. Realizar un informe de los resultados obtenidos.
2. 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. 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 D P. Inmunología Básica y Clínica. 10º 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.cmaj.ca/cgi/content/full/174/3/305
- www.scribd.com/doc/2450367
- www.scielo.cl/pdf/rcp/v50n2/art03.pdf

TRABAJO PRÁCTICO N° 6

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 anti HBs. Dot Blot - Immunocomb.
2. Detección de anticuerpos anti VIH. ELISA 4º generación.
3. Detección de antígeno de superficie para hepatitis B. 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

Mujer de 27 años, embarazada de 14 semanas, primípara. Se realiza estudios de laboratorio donde se observa que la serología para toxoplasmosis resulta positiva 1/4096 por HAI.

La paciente comenta que no tiene animales domésticos en su domicilio y que en el primer trimestre de su embarazo se controló en su CAPS y la serología fue negativa.

- a) ¿Qué estudios le realizaría y qué metodología considera sería la más apropiada para confirmar o descartar el diagnóstico de toxoplasmosis?
- b) ¿Por qué piensa que la embarazada se considera inmunosuprimida? ¿Cómo lo demuestra en el laboratorio?
- c) ¿Qué ventajas tendría realizar el diagnóstico oportuno? Si la serología no fuera concluyente, ¿qué podría realizar en el laboratorio?
- d) ¿Sería lo mismo si la paciente no estuviera embarazada? ¿Cuál sería la actitud terapéutica en cada caso?

CASO CLINICO N° 2

EL Ministerio de Salud Pública introduce la vacuna contra hepatitis A en forma obligatoria a partir del año de edad. Esta debe ser aplicada en el mismo momento que se aplica la vacuna triple viral.

Lorena, por desconocimiento al vivir en una zona rural del interior de la provincia de Corrientes, no vacunó a sus niños.

Sofía, la hija mayor de Lorena que hoy cuenta con 13 años comenta que su compañera de colegio tiene hepatitis A.

- a) La mamá desesperada acude al centro asistencial y pide que vacunen a Sofía ¿Qué haría Ud? Justifique y mencione que métodos de laboratorio utilizaría en caso de realizar algún estudio inmunológico.
- b) ¿Qué es la vacuna triple viral? ¿Cree que podría haber interferencias en la respuesta inmune si coloca el mismo día la triple viral y la de hepatitis A?
- c) ¿Qué tipo de vacunas son? Si Sofía fuera portadora de una IDCS ¿qué le aconsejaría? Justifique.

CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

- ¿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 de los resultados obtenidos en los ensayos desarrollados en el TP.
- Interpretar los casos clínicos, adjuntando la bibliografía consultada en cada caso.

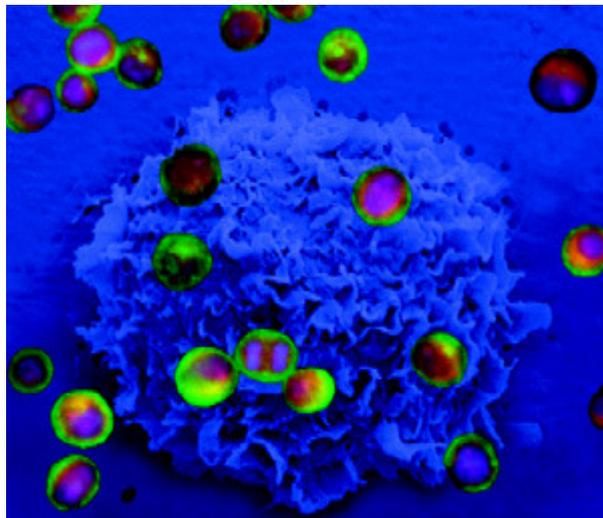
BIBLIOGRAFÍA

- 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 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° 7

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.

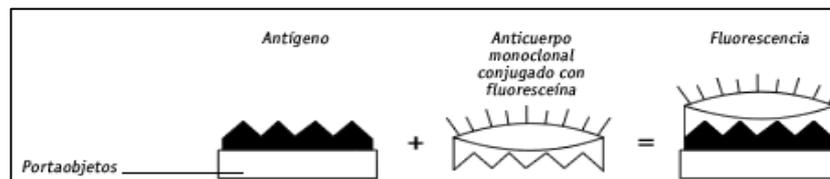
Ensayos de Inmunofluorescencia (IF)

- 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.

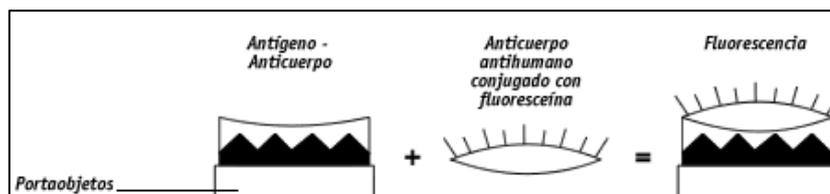
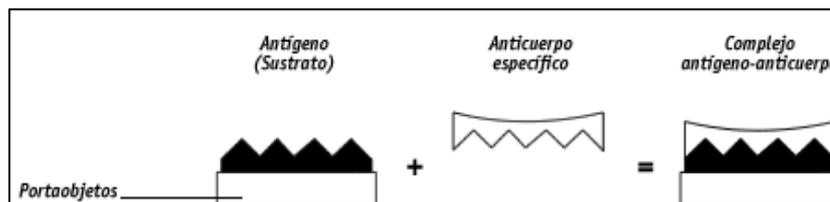
- Los **ensayos de fluorescencia para la detección de anticuerpos** utilizan el método de tinción indirecto descrito por primera vez por Weller y Coons en 1954. El procedimiento se realiza en dos pasos básicos de reacción. En el primer paso, el suero humano a ensayar es puesto en contacto con el sustrato 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.

a) **DETECCION DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES**, utilizando distintos sustratos: improntas de hígado de rata, combinadas y línea celular Hep-2; *Crithidia luciliae*.

b) **DETECCIÓN DE ANTICUERPOS** de distintos isotipos utilizando como sustrato *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* y *Treponema pallidum*.

En ambos casos se seguirán estrictamente las instrucciones de los reactivos provistos por el laboratorio Biocientífica SA

c) **DETECCION DE ANTICUERPOS ANTI- CANDIDA POR TÉCNICA DE INMUNOFLUORESCENCIA**

OBJETIVO

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

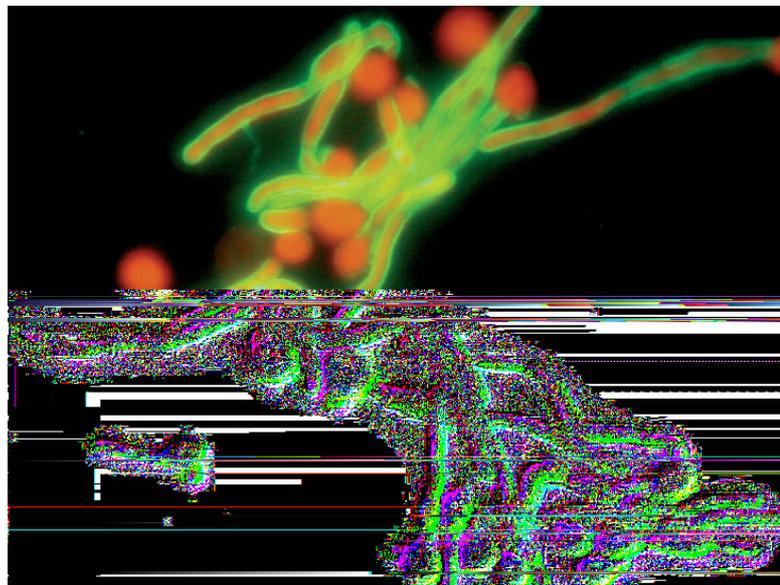
MATERIALES Y MÉTODOS

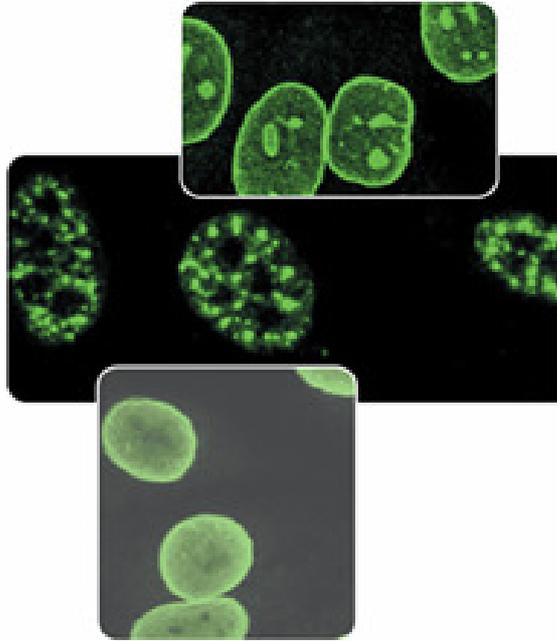
- *Cándida albicans*
- Buffer PBS
- CFDA
- Suero anti-*Cándida*, obtenido a partir de la inmunización de conejo con *C albicans* formoladas.
- Complemento de conejo.
- Bromuro de etidio-EDTA.
- Glicerina tamponada.
- Centrífuga
- Vortex
- Microscopio de fluorescencia

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 20 μ l 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.





CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N°1

Paciente femenina de 18 años de edad, natural y procedente de Saladas, asiste al Postgrado de Periodoncia de la Facultad de Odontología de la UNNE. por presentar una sensación de ardor y un eritema intenso a nivel gingival. Se realiza la Historia Clínica exhaustiva y en la anamnesis no existen antecedentes personales ó familiares pertinentes a la lesión.

Al examen clínico presenta un eritema lineal en toda la zona gingival y unas pequeñas ulceraciones en piso de boca.

En las palmas de las manos la paciente presenta unas lesiones descamativas acompañadas de intenso prurito.

A la paciente se le indican exámenes radiográficos bucales y se planifica un tratamiento periodontal conservador acompañado con la instrucción sobre Higiene Oral. En vista de la persistencia de las lesiones bucales en ausencia de irritantes locales, se solicita la interconsulta a los Servicios de Dermatología y Ginecología del Hospital Clínico Universitario y Los exámenes radiográficos muestran las estructuras anatómicas propias de la región sin indicios de patología. El Servicio de Ginecología, mediante un informe escrito, descartó patologías a nivel genital

El Servicio de Dermatología diagnosticó las lesiones palmares como una DERMATITIS POR CONTACTO la cual no tenía relación con las lesiones bucales.

Se indican exámenes de laboratorio (Hematología completa, PT, PTT, Tiempo de coagulación, V.D.R.L. y Elisa para descartar V.I.H), los cuales resultaron dentro de valores normales, biopsia incisional para estudios histopatológicos y de Inmunofluorescencia directa.

- a) ¿Qué características inmunopatológicas presenta la DERMATITIS DE CONTACTO?
- b) ¿Qué utilidad tendría realizar la IFD? ¿Qué patología se sospecharía?
- c) ¿Considera que sería de utilidad realizar la IFI específica? Justifique
- d) ¿Qué estudios adicionales de laboratorio considera útil realizar para confirmar el diagnóstico? Mencione el método que utilizaría en cada caso.

CASO CLÍNICO N 2

Paciente mujer de 26 años, procedente de Curuzú Cuatiá, que ingresó al Hospital Escuela con un tiempo de enfermedad de 1 año, de inicio insidioso y curso progresivo, con dolor tipo cólico en hipocondrio derecho post ingesta de alimentos, meteorismo y estreñimiento.

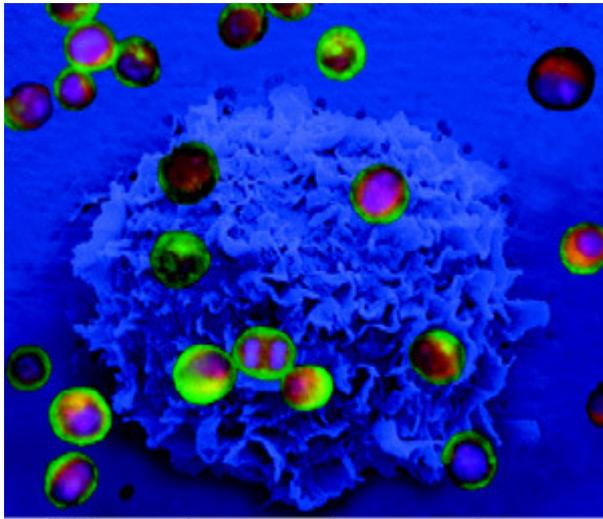
Antecedentes patológicos: no contributorios.

Al examen físico: PA: 120/70 mmHg., FC: 78x', FR: 18x', T: 37°C. Piel y mucosas con leve ictericia. Abdomen blando, depresible, con dolor leve a la palpación en hipocondrio derecho, hígado a 2 cm. por debajo de reborde costal derecho. El resto del examen físico se encontraba dentro de límites normales.

Tomografía abdominal helicoidal: Hígado de bordes regulares con presencia de imagen hipodensa de 11,3 por 11,3 por 14 cm., con bordes bien definidos que ocupan segmento 8, 7 y 5, sugestiva de hidatidosis, con prominencia del volumen hepático. Bazo aumentado de tamaño. No dilatación de vías biliares intra y extrahepáticas. Vesícula biliar de paredes gruesas con múltiples cálculos.

- a) ¿Qué importancia tiene realizar una anamnesis adecuada? ¿todas las especies de equinococcus producen enfermedad en el humano?
- b) Qué estudios sugeriría realizar en el laboratorio, teniendo en cuenta la presentación del caso? Mencione el método que utilizaría en cada caso.
- c) ¿Cómo obtendría el antígeno que utilizaría en las pruebas de laboratorio?
- d) ¿Es factible el diagnóstico por técnicas de biología molecular?

AUTOINMUNIDAD



- 1- Desarrollo de Algoritmo en Autoinmunidad
- 2- Desarrollo de temas o casos clínicos seleccionados por los alumnos
- 3- Desarrollo de casos clínicos propuestos.

CASO CLÍNICO N° 3

Figura 1. Placas anulares eritematosas no descamativas en cuero cabelludo, primeras en aparecer.



Figura 2. Placas anulares eritematosas no descamativas, urticariformes, localizadas en zona abdominal y suprapúbica (donde se realizó la biopsia).



Lactante de 46 días de edad, fruto de un embarazo a término, de peso adecuado para su edad gestacional. Embarazo de riesgo y controlado por antecedente de lupus eritematoso sistémico (LES) materno en tratamiento con cloroquina, siendo negativos los marcadores maternos para LES en el momento de la concepción; exámenes de rutina normales.

El lactante consulta en las urgencias de un hospital por vómitos en dos ocasiones, mientras estaba con lactancia mixta, al 41° día de vida consulta de nuevo por este motivo, realizándose una analítica en la que presentó 9.220 leucocitos, neutropenia con 11,9% de eosinófilos y anemia ferropénica, sedimento de orina y urocultivo negativos. Ante la presencia de eosinofilia en la analítica y con clínica de vómitos se le diagnostica intolerancia a proteínas de leche de vaca, por lo que se es remitido al especialista de Alergología. Con 46 días de vida el paciente acude a consulta con máculas anulares, policíclicas, localizadas en cabeza y zona anterior del tronco y pubis.

- a) ¿Qué estudios considera importante realizar para descartar algún fenómeno alérgico? Justifique.
- b) ¿Qué estudios solicitaría teniendo en cuenta la enfermedad de la madre? ¿Qué métodos de laboratorio utilizaría en cada caso?
- c) ¿Cómo efectuaría el seguimiento del niño?
- d) ¿Con qué patologías debería realizar el diagnóstico diferencial? ¿Cómo las evaluaría en el laboratorio y qué métodos diagnósticos utilizaría?
- e) ¿Qué diferencias existen entre LES y LE cutáneo? ¿Qué pronóstico presenta cada una de ellas en pediatría?

CASO CLÍNICO N 4

Paciente mujer 25 años, natural y procedente de Goya, ingresó el 5 de marzo del 2010. Paciente inicia su enfermedad un mes antes de ingresar al hospital, con sensación de debilidad, asociada a disnea a grandes esfuerzos, posteriormente a medianos esfuerzos. Simultáneamente tiene náuseas y nota que la orina se torna de color café.

La paciente se había realizado por cuenta propia un examen de orina:

Proteínas ++,

Hemoglobina: +++

Leucocitos: 2-3/campo,

Hematíes: 40-60/campo.

Urocultivo: pendiente resultado.

Acude a médico particular quien le diagnostica infección urinaria y le prescribe Ciprofloxacino y Gentamicina; con estos medicamentos no nota mejoría.

La sintomatología aumenta progresivamente y vuelve a consultar con su médico quien luego de exámenes auxiliares le diagnostica insuficiencia renal y le sugiere control hospitalario.

- a) ¿Considera que el resultado del estudio de orina corresponde a infección urinaria?
- b) ¿Qué estudios solicitaría para realizar el diagnóstico de IR? ¿Cómo diferencia la forma aguda de la crónica?

CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

- 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

- 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. 10ª Edición. Editorial El Manual Moderno. 2003. ISBN 9684269978.

TRABAJO PRÁCTICO N° 8

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.

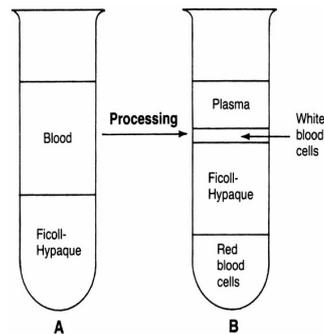
Todo paciente con IRC terminal inscripto en lista de espera en el INCUCAI para acceder a un trasplante con donante cadavérico se realiza cada 3 meses esta prueba enfrentando su suero a un panel de linfocitos, esta técnica se conoce como CROSSMATCH FRENTE A PANEL O ANTICUERPOS REACTIVOS FRENTE A PANEL (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 MÉTODOS

- 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 OBSERVACION 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-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 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 10⁶ células en un tubo y centrifugar a 3500 rpm durante 5 minutos. Eliminar el sobrenadante.
- 11- Al pellet agregar 50 µl 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 OBSERVACION 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-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 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



ruggia0041c fotosearch.com

CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

Domingo M. tiene 35 años, es soltero y vive con sus padres en una ciudad próxima a Corrientes. Como antecedentes patológicos presenta una hiperoxaluria primaria que provocó una IRC. Inició hemodiálisis en 1992; al año siguiente recibió un trasplante hepato-renal del que hizo un rechazo renal agudo al cabo de un mes que desencadenó una nefropatía crónica del injerto renal e insuficiencia renal con clínica urémica, precisando de tratamiento con hemodiálisis. Situación actual

Domingo M, ingresa en la unidad de cuidados intensivos en 1994 para ser sometido a un doble re-trasplante hepato-renal. Se procede a la valoración preoperatoria y a la realización de pruebas diagnósticas.

El paciente está consciente, orientado y un poco nervioso. Presenta edemas maleolares y abdomen blando, depresible, no doloroso, con ascitis. Se palpa riñón en el flanco derecho. Signos vitales: presión arterial 130/75 mmHg, frecuencia cardiaca: 60 lat/min y frecuencia respiratoria 18 respiraciones/min. Ninguna prueba diagnóstica contraindica la intervención.

- a) ¿Por qué la hiperoxaluria es capaz de provocar una IRC? ¿Qué diferencia existe entre IRC e IRA?
- b) ¿Qué estudios debió realizarse el paciente cuando se realizó el trasplante hepato-renal en 1992?
- c) ¿Cuáles pueden ser las causas del rechazo renal agudo que desencadenó en una nefropatía crónica del injerto?
- d) Ante el nuevo trasplante, ¿Qué estudios considera se deberían repetir? Justifique.

CASO CLÍNICO N° 2

Varón de 17 años de edad, con insuficiencia renal crónica terminal (IRCt) desde hace un año. Ocho meses después de iniciada la terapia de hemodiálisis crónica, el paciente fue sometido a trasplante renal con donante vivo relacionado. En el periodo post trasplante inmediato recibió terapia de inducción con timo globulina 2mg/kg/dosis y metilprednisolona 1mg/kg. La diuresis en las primeras 24 horas fue de 1200 cc; sin embargo, la mejoría de la función renal fue lenta, siendo dado de alta a los diez días, con terapia con tacrolimus 13 mg/día y mofetil micofenolato (MMF) 1,5 mg/día; la depuración de creatinina era 69 ml/min/1,73m² SC, creatinina sérica en 1,5 mg/dl y proteinuria en 24 h en 441 mg. A las dos semanas del trasplante, la creatinina sérica

aumentó a 3 mg/dl, siendo tratado como rechazo agudo leve, recibiendo tres pulsos de metilprednisolona de 1gr, 0,5 gr y 0,5 gr, respectivamente. El paciente fue evaluado por primera vez en nuestro hospital en el 39° día del trasplante; su tratamiento inmunosupresor era tacrolimus 12 mg/día, MMF 1 gr/día y prednisona 20 mg/día. Las manifestaciones clínicas eran cefalea, náuseas, temblor en extremidades, agitación y poliuria de hasta 6 litros diarios, sobrepeso, taquicardia y presión arterial normal. Los exámenes auxiliares mostraron anemia leve, creatinina sérica 2,3 mg/dl y proteinuria 1,37 gr/24 horas. La serología para citomegalovirus (CMV) y Epstein Barr, fue negativa. El nivel sérico de tacrolimus fue 9,5 ng/ml. El ecodoppler mostró un índice de resistencia de hasta 0,63 el cual no correlacionaba con los niveles de creatinina sérica. La gammagrafía renal no mostró patrón obstructivo. A pesar de mantener una dosis adecuada de inmunosupresores, la creatinina sérica del paciente se incrementó, llegando hasta 4 mg/dl al octavo mes postransplante.

- a) En un trasplante con donante vivo relacionado ¿Quién/quienes pueden ser potenciales donantes? ¿Qué estudios de laboratorio se solicitan al donante? ¿y al receptor?
- b) Describa las drogas inmunosupresoras utilizadas
- c) ¿Qué sospecha? ¿Qué estudios realizaría?

CUESTIONARIO DE ORIENTACIÓN

- 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

- Interpretar los resultados obtenidos a partir del paciente en estudio.
- Interpretar los casos clínicos.

TRABAJO PRÁCTICO N° 9

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.

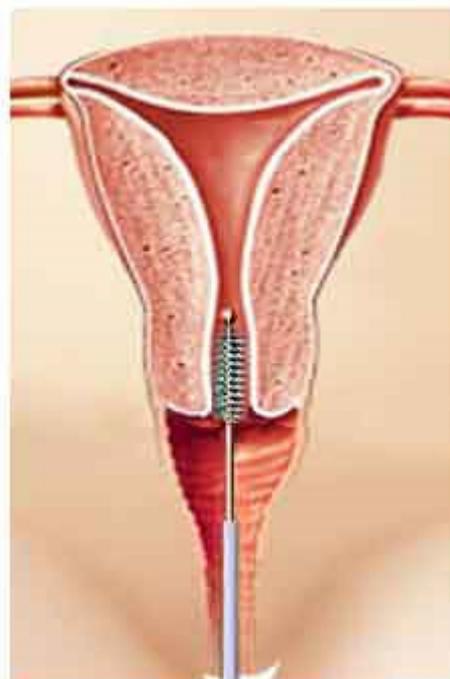
El método consiste en tres etapas de diferentes temperaturas, que se repiten entre 25 a 30 veces, según los diferentes protocolos de laboratorio. La primera etapa, a 95 °C, desnatura el ADN, la segunda permite mediante la elección de la temperatura la hibridación de los cebadores al ADN, delimitando 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.

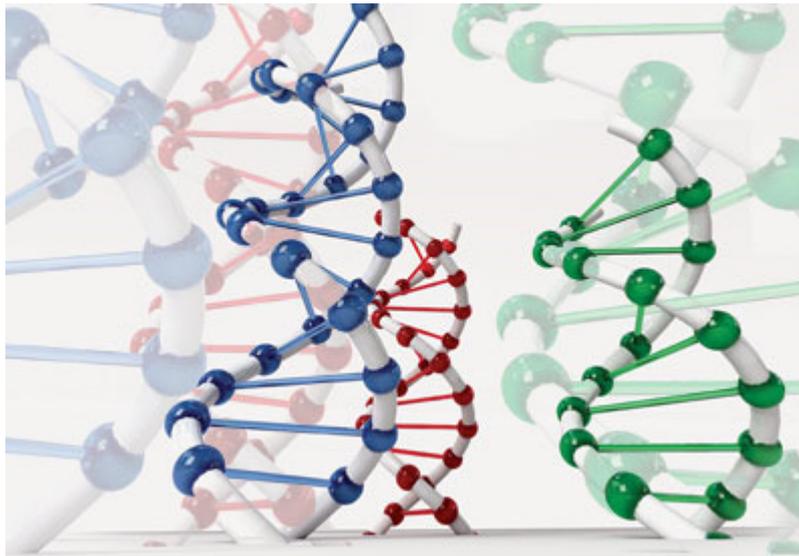
MATERIALES Y MÉTODOS

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:isoamilico* (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 µl de agua estéril o buffer TBE (para facilitar una buena resuspensión se puede colocar el tubo a 52°C por 15 minutos).





CASOS CLÍNICOS

CASO CLÍNICO N° 1

Paciente femenina de 24 años de edad, consulta al ginecólogo en examen control, presentando imagen en mosaico aceto blanca en cuello de útero al realizarse un estudio colposcópico. Luego con técnica de Papanicolaou se detectan células binucleadas e hiperchromasia.

- a) Cuáles son los estudios clásicos de exploración ginecológica
- b)Cuál sería el diagnostico a priori, sin aplicar otras técnicas de mayor complejidad.
- c) Describa brevemente alguna técnica molecular que permita detectar el agente etiológico.
- d) Describa distintas terapias a aplicar y vacunación vigente.

CASO CLÍNICO N° 2

Mujer de 30 años consulta al ginecólogo por dolor tipo menstrual intermitente y escasa leucorrea.

Refiere haberse realizado exudado vaginal y cultivo de orina, los cuales resultaron negativos y ecografía, en la cual se observó imagen compatible con síndrome inflamatorio sin obstrucción.

- a) Indique diagnóstico presuntivo.
- b) Qué microorganismos pueden causarlo? Mencione técnicas de detección.
- c) Diseñe una técnica de PCR multiplex para detectarlos.

BIBLIOGRAFÍA:

- Watson,J.; Tooze, J.; Kurtz,D. ADN Recombinante. Ediut. Labor. 5:20-25. 1988.
- Lodish – Berk – Zipursky – Baltimore. Molecular Cell Biology. Edfit Media Connected. 4º Edition. 7: 191-196. 2000.
- Susuky – Griffit-. Muller- Lewontin. Genetica. 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, R. V. 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, R. V. 2000. The molecular epidemiology of nosocomial infection: past, present and future. *Reviews in Medical Microbiology*, 11(3): 145-152.