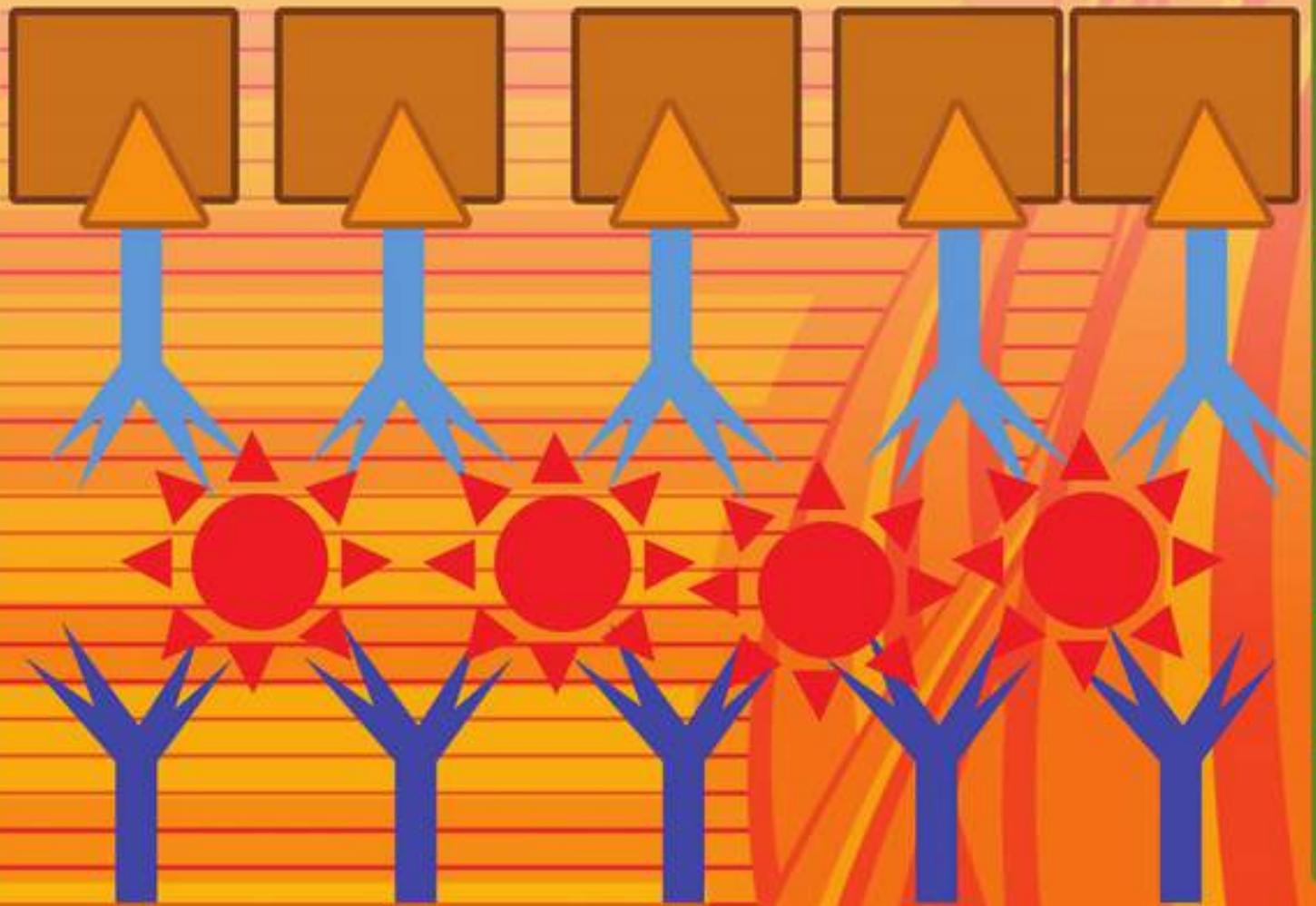




INMUNOLOGÍA VETERINARIA

(MANUAL DE PRÁCTICAS)



Abril, 2016

Prohibida la reproducción total o parcial por cualquier medio sin la autorización escrita del titular de los derechos patrimoniales.

Hecho en México



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTILÁN

Inmunología Veterinaria (Manual de prácticas)

Medicina Veterinaria y Zootecnia

José Antonio Licea Vega
Marco Antonio Mendoza Saavedra
María del Consuelo Álvarez Rodríguez
Tonatiuh Alejandro Cruz Sánchez
Cynthia González Ruiz
Raúl García Tinajero
Edna Maribel Legaspi Nuevo
Juan Antonio Montaraz Crespo
Marco Antonio Muñoz Guzmán
Javier Alejandro Buendía Jiménez
María del Carmen Lili Muñoz Rivera
María Leonor Quintero Mora
Gerardo Arcila López-Tello
Alma Noemí Montes de Oca Chávez
Silviano Trejo Núñez

ÍNDICE

	PÁGINA
INTRODUCCIÓN	7
I. OBJETIVOS GENERALES DE LA ASIGNATURA	8
II. OBJETIVO DEL CURSO EXPERIMENTAL	8
III. REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS	9
IV. REGLAMENTO ESPECÍFICO PARA EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA	11
V. CONCORDANCIA CON EL PROGRAMA DE TEORÍA	11
VI. BIOSEGURIDAD	12
VII. ACTIVIDADES PREVIAS A LAS PRÁCTICAS	21
PRÁCTICAS	
1. Introducción, importancia de las pruebas inmunológicas en la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia	22
2. Los animales de laboratorio	28
3. Diluciones	50
4. Determinación de gammaglobulinas en becerro neonato	59
5. Aglutinación	72
6. Determinación del grupo sanguíneo	91
7. Precipitación	99
8. Inmunofluorescencia	109
9. Pruebas que detectan inmunidad celular (Intradermoreacción)	118
10. Análisis inmunoabsorbente ligado a una enzima (ELISA)	128
11. Elaboración de una bacterina	142

INTRODUCCIÓN

La Inmunología es una de las muchas asignaturas en la formación del Médico Veterinario Zootecnista (MVZ) con contenidos teóricos, para ser abordados en el salón de clase, y contenidos prácticos para realizar en el laboratorio de docencia.

El “Manual de Prácticas de Inmunología” que aquí se presenta se avoca a los contenidos prácticos de la asignatura y está pensado como un apoyo didáctico al estudiante de MVZ que le garantiza y facilita aspectos importantes en su formación presente, y que puede auxiliario en sus tareas a futuro; entre esos aspectos se pueden resaltar los siguientes:

a) Sus contenidos y procedimientos representan el consenso entre los profesores involucrados en la impartición teórico-práctica de la asignatura.

b) Los procedimientos descritos para el desarrollo de cada una de las prácticas han sido ensayados y estandarizados de tal manera que el estudiante pueda concentrarse en el desarrollo de los mismos con la certidumbre de obtener los resultados esperados.

c) Al ser un material pensado y preparado por los expertos del área, el estudiante puede conservarlo para usos futuros, como puede ser el desarrollo de su servicio social, su trabajo de tesis, y hasta como punto de partida si su ejercicio profesional lo lleva a desarrollar o supervisar alguno, o algunos, de los procedimientos que el Manual contiene.

Si al concluir el curso de Inmunología, el estudiante relejera lo aquí dicho y coincidiera, aunque fuera con una parte de ello, el esfuerzo invertido para la realización del Manual se vería sobradamente recompensado.

I. OBJETIVOS GENERALES DE LA ASIGNATURA

Que el alumno adquiriera los conocimientos elementales de inmunología, necesarios para la interpretación de las técnicas básicas de unión antígeno-anticuerpo en el diagnóstico de enfermedades.

Que el alumno adquiriera los principios generales de la inmunoprolifaxis (vacunación).

Que el alumno comprenda el papel que juega la inmunidad innata y adaptativa en contra de diversos agentes infecciosos tales como: virus, bacterias y parásitos.

Que el alumno comprenda los mecanismos elementales de la respuesta inmune y de su regulación para la comprensión de desórdenes inmunológicos, enfermedades autoinmunes e hipersensibilidad.

II. OBJETIVO DEL CURSO EXPERIMENTAL

Que el alumno adquiriera los conocimientos elementales de Inmunología necesarios para la realización e interpretación de las técnicas básicas de unión antígeno-anticuerpo en el diagnóstico de enfermedades.

III. REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS

REGLAMENTO GENERAL PARA LOS LABORATORIOS DEPARTAMENTO DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

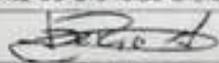
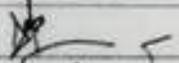
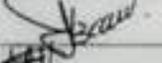
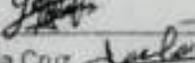
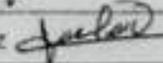
FECHA DE REVISIÓN: 30/06/2014

No. de REVISIÓN: 3

- 1) Este reglamento aplicará para personal académico, alumnos y laboratoristas.
- 2) Para todo trabajo realizado en el laboratorio deberá utilizarse bata blanca con manga larga.
- 3) La tolerancia para el inicio de la sesión de laboratorio será hasta de 10 minutos a partir de la hora señalada.
- 4) Por seguridad, no deben cerrarse las puertas del laboratorio con llave durante las prácticas.
- 5) En todo momento deberá mostrarse una conducta adecuada en el área de trabajo.
- 6) Queda prohibido en los laboratorios:
 - a) Tirar basura fuera del cesto.
 - b) Ingerir alimentos y/o bebidas.
 - c) Fumar.
 - d) Recibir visitas.
 - e) La entrada a los inter-laboratorios a toda persona ajena a los mismos.
 - f) Realizar reuniones o convivios en los laboratorios.
 - g) Salir del laboratorio en el horario asignado para la sesión experimental.
 - h) Sentarse sobre las mesas de trabajo.
 - i) Mover el mobiliario de su lugar.
 - j) Utilizar las gavetas para guardar material que no corresponda a la asignatura.
- 7) Los residuos peligrosos deben depositarse en los contenedores destinados para tal fin, entendiendo por residuo peligroso: elementos, sustancias, compuestos, desechos o mezclas de ellos que en cualquier estado físico representan un riesgo para el ambiente, la salud o los recursos naturales, por

sus características corrosivas, reactivas, explosivas, tóxicas, inflamables o biológico-infecciosas (Art. 3º de la Ley General del Equilibrio y Protección del Ambiente).

- 8) Dentro del laboratorio no se permite el uso de teléfonos celulares, reproductores de sonido o cualquier medio electrónico de entretenimiento. El uso de las computadoras portátiles queda restringido a temáticas relacionadas con la asignatura.
- 9) El acceso al laboratorio se permitirá únicamente cuando esté presente uno de los profesores del grupo.
- 10) El uso del laboratorio para trabajo extraordinario, deberá programarse con el profesor responsable en un horario que no interfiera con aquel destinado para el desarrollo de las prácticas.
- 11) Para solicitar material y equipo, es requisito indispensable que el alumno llene debidamente el vale de material (FPE-CB-DEX-01-09) y lo entregue a la persona responsable, dejando como depósito la credencial vigente de la UNAM.
- 12) El alumno deberá revisar el material y/o equipo al momento de recibirlo, indicando cualquier anomalía (faltante o material dañado) y será devuelto en las condiciones en que se recibió, de no hacerlo, se hará acreedor a las sanciones establecidas en cada laboratorio.
- 13) Es obligación de todos mantener limpio y ordenado el lugar de trabajo y todo el laboratorio.

Vo. Bo. Comité de Calidad del Departamento de Ciencias Biológicas	
Jefe del Comité de Calidad: Dr. Juan Carlos del Río García 	
Jefes de Sección	Responsables de Calidad
QFB Rosaísa Bonilla Sánchez 	QFB Gabriela Escalante Reynoso 
Dr. Salvador Fonseca Coronado 	QFB Ladislao Palomar Morales 
MC Javier Froylán Lazcano Reyes 	QFB Juana Alicia Alquicira Camacho 
MVZ Olivia Adams Vázquez 	MVZ Esp Hugo César López Farías 
MC Juan Carlos Valladares de la Cruz 	MVZ Graciela Castañeda Aceves 

IV. REGLAMENTO ESPECÍFICO PARA EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

Dentro del laboratorio está prohibido:

- a) El uso de gorras, sombreros, boinas, etc.
 - b) El consumo de todo tipo de golosinas
 - c) El uso de lentes oscuros durante la sesión del laboratorio
1. El alumno está obligado a respetar fechas y tiempos señalados por el profesor
 2. El alumno está obligado a cooperar con el material que le sea solicitado por el laboratorio de inmunología, para la realización de su práctica.
 3. La entrega de los cuestionarios se realizará al inicio de cada sesión práctica, y aquellos que requieran de datos obtenidos durante la misma, se entregarán en la siguiente sesión.
 4. Todo material de desecho biológico potencialmente infeccioso será depositado donde le indique el profesor.
 5. El material de cristalería y plástico contaminado, será depositado en los recipientes destinados para el mismo.
 6. El alumno con cabello largo debe sujetárselo durante la sesión práctica.

V. CONCORDANCIA CON EL PROGRAMA DE TEORÍA

Número de Práctica	Título de la Práctica	Número y Nombre de la Unidad Temática en el Programa de la Asignatura
1	Introducción, Importancia de las pruebas inmunológicas en la carrera de Medicina Veterinaria y Zootecnia.	1. Introducción a la Inmunología
2	Los animales de laboratorio	1. Introducción a la Inmunología
3	Diluciones	10. Pruebas de Diagnóstico

4	Determinación de gammaglobulinas en el becerro neonato.	3. Tipos de Inmunidad
5	Aglutinación	7. Inmunidad Humoral 10. Pruebas de Diagnóstico
6	Determinación del grupo sanguíneo	10. Pruebas de Diagnóstico
7	Precipitación	7. Inmunidad Humoral 10. Pruebas de Diagnóstico
8	Inmunofluorescencia	10. Pruebas de Diagnóstico
9	Pruebas que detectan inmunidad celular (Intradermoreacción)	9. Inmunidad Celular
10	Análisis Inmunoabsorbente Ligado a una Enzima (ELISA).	7. Inmunidad Humoral 10. Pruebas de Diagnóstico
11	Elaboración de bacterina	12. Vacunas y Vacunación

VI. BIOSEGURIDAD

El nivel de bioseguridad laboral sigue siendo un área de especial interés para el personal que trabaja en un laboratorio de microbiología clínica.

Los peligros relativos que entrañan los microorganismos infecciosos, están clasificados por grupos de riesgo, término que se utilizará exclusivamente para el trabajo de laboratorio. Se describen esos grupos de riesgo.

Clasificación de los microorganismos infecciosos por grupos de riesgo

Grupo de riesgo 1 (*riesgo individual y poblacional escaso o nulo*).

Microorganismos que tienen pocas probabilidades de provocar enfermedades en el ser humano o los animales.

Grupo de riesgo 2 (*riesgo individual moderado, riesgo poblacional bajo*).

Agentes patógenos que pueden provocar enfermedades humanas o animales pero que tienen pocas probabilidades de entrañar un riesgo grave para el personal de laboratorio, la población, el ganado o el medio ambiente. La exposición en el laboratorio puede provocar una infección grave, pero existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces y el riesgo de propagación es limitado.

Grupo de riesgo 3 (*riesgo individual elevado, riesgo poblacional bajo*).

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades humanas o animales graves, pero que de ordinario no se propagan de un individuo a otro. Existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Grupo de riesgo 4 (*riesgo individual y poblacional elevado*).

Agentes patógenos que suelen provocar enfermedades graves en el ser humano o los animales y que se transmiten fácilmente de un individuo a otro, directa o indirectamente. Normalmente no existen medidas preventivas y terapéuticas eficaces.

Los laboratorios se clasifican en cuatro niveles de bioseguridad . Las designaciones del nivel de bioseguridad se basan en una combinación de las características de diseño, construcción, medios de contención, equipo, prácticas y procedimientos de

operación necesarios para trabajar con agentes patógenos de los distintos grupos de riesgo. En el cuadro 1 se muestran las especificaciones de estos laboratorios.

Cuadro 1

RELACIÓN DE LOS GRUPOS DE RIESGO CON LOS NIVELES DE BIOSEGURIDAD,
LAS PRÁCTICAS Y EL EQUIPO

GRUPO DE RIESGO	NIVEL DE SEGURIDAD	TIPO DE LABORATORIO	PRÁCTICAS DE LABORATORIO	EQUIPO DE SEGURIDAD
1	Básico Nivel 1	Enseñanza básica, investigación	TMA	Ninguno; trabajo en mesa de laboratorio al descubierto
2	Básico Nivel 2	Servicios de atención primaria; diagnóstico, investigación	TMA y ropa protectora; señal de riesgo biológico	Trabajo en mesa al descubierto y CSB para posibles aerosoles
3	Contención Nivel 3	Diagnóstico especial, investigación	Prácticas de nivel 2, más ropa especial, acceso controlado y flujo direccional del aire	CSB además de otros medios de contención primaria para todas las actividades

4	Contención máxima Nivel 4	Unidades de patógenos peligrosos	Prácticas de nivel 3, más cámara de cierre hermético, salida con ducha y eliminación especial de residuos	CSB de clase III o trajes presurizados con CSB de clase II, autoclave de doble puerta (a través de la pared), aire filtrado.
TMA: Técnicas Microbiológicas Apropriadas. CSB: Cámara de Seguridad Biológica.				

Los países o regiones deberán elaborar una clasificación nacional o regional de los microorganismos en grupos de riesgo, teniendo en cuenta los siguientes factores:

1. La patogenicidad del microorganismo.
2. El modo de transmisión y la gama de huéspedes del microorganismo. Estos dos factores pueden depender de los niveles de inmunidad existentes en la población local, la densidad y los movimientos de la población de huéspedes, la presencia de vectores apropiados y el nivel de higiene ambiental.
3. La disponibilidad local de medidas preventivas eficaces, entre las que cabe citar la profilaxis mediante la administración de antisueros (inmunización pasiva) o vacunas; las medidas de higiene (higiene de los alimentos y del agua, por ejemplo), y la lucha contra los reservorios animales o los artrópodos vectores.
4. La disponibilidad local de tratamientos eficaces, que comprende la inmunización pasiva, la vacunación pos exposición y la administración de antimicrobianos, antivíricos y quimioterapia, y debe tener en cuenta la posibilidad de que aparezcan cepas farmacorresistentes.

La asignación de un agente a un nivel de bioseguridad para el trabajo de laboratorio, debe basarse en una evaluación del riesgo. Esa evaluación tendrá en cuenta el grupo de riesgo, además de otros factores, con el fin de determinar el nivel de bioseguridad más apropiado. Por ejemplo, un agente patógeno asignado al grupo de riesgo 2 en general requerirá instalaciones, equipo, prácticas y procedimientos del nivel de bioseguridad 2 para trabajar sin riesgo.

No obstante, si ciertos experimentos entrañan la generación de aerosoles con elevadas concentraciones, quizá sea más apropiado el nivel de bioseguridad 3 para proporcionar el grado necesario de seguridad, pues garantiza una mayor contención de los aerosoles en el entorno de trabajo del laboratorio.

Por consiguiente, el nivel de bioseguridad asignado a un trabajo concreto dependerá del juicio profesional basado en la evaluación del riesgo, y no en la asignación automática de un nivel de bioseguridad con arreglo al grupo de riesgo particular al que pertenezca el agente patógeno con el que se va a trabajar.

En el cuadro 2 se resumen los requisitos de las instalaciones en los cuatro niveles de bioseguridad.

Cuadro 2
RESUMEN DE LOS REQUISITOS POR NIVEL DE BIOSEGURIDAD

	NIVEL DE BIOSEGURIDAD			
	1	2	3	4
Aislamiento ^a del laboratorio	No	No	Si	Si
Sala que pueda ser descontaminada	No	No	Si	Si
Ventilación: — Flujo de aire hacia el interior — Sistema de ventilación controlada — Salida de aire con HEPA				

No				
Conveniente				
Si				
Si				
	No	Conveniente	No	Si
	No	No	Si/No ^b	Si
Entrada de doble puerta	No	No	Si	Si
Cámara de cierre hermético	No	No	No	Si
Cámara de cierre hermético con ducha	No	No	No	No
Antesala	No	No	Si	-
Antesala con ducha	No	No	Si /No ^c	No
Tratamiento de efluentes	No	No	Si /No ^c	Si
Autoclave:	No	Conveniente	Si	Si
— En el local	No	No	Conveniente	Si
— En la sala de trabajo	No	No	Conveniente	Si
— De doble puerta	No	No	Conveniente	Si
CSB	No	Conveniente		Si
Capacidad de vigilancia de la seguridad del personal	No	No	Conveniente	Si

- a** Aislamiento ambiental y funcional con respecto del tráfico general.
 - b** Según la localización de la salida de aire (véase el capítulo 4).
 - c** Según cuáles sean los agentes empleados en el laboratorio.
 - d** Por ejemplo: ventana, sistema de televisión en circuito cerrado, comunicación en dos sentidos.
- HEPA:** filtración de partículas aéreas de gran eficiencia (del inglés *High-Efficiency Particulate Air*).
- CSB:** cámara de seguridad biológica.

NORMAS GENERALES DE SEGURIDAD BIOLÓGICA

Las normas generales son comunes para las distintas áreas del laboratorio con nivel de bioseguridad 1 y 2 siendo obligatorio su cumplimiento.

El acceso al laboratorio está limitado a personal autorizado.

- El personal del laboratorio debe implicarse en el cumplimiento de las normas de seguridad.
- Las puertas de acceso al laboratorio y al área a debe estar debidamente marcada con la señalización internacional de riesgo biológico como se muestra en la ilustración y su nivel de contención biológica, con el nivel 2 (NST2).



Señal de peligro biológico

También se señalarán los congeladores y refrigeradores utilizados para guardar microorganismos de riesgo de tipo 2.

- Las puertas y ventanas deben permanecer cerradas para mantener la adecuada contención biológica.
- El laboratorio estará separado del pasillo de circulación por un vestíbulo.
- El laboratorio debe ser ventilado regularmente. El aporte de aire nuevo será como mínimo de 6.0 m³ por persona / hora.
- Todas las superficies de trabajo se limpiarán y desinfectarán diariamente; Los residuos y muestras peligrosas, que van a ser incinerados fuera del laboratorio, deberán ser transportados en contenedores cerrados, resistentes e impermeables, siguiendo las normas específicas para cada tipo de residuo (ver más adelante).
- El área del laboratorio debe permanecer limpia y ordenada.
- La Unidad deberá disponer de un lavabo para el lavado de las manos que funcionará presionando con el codo o con el pie.
- El transporte de muestras dentro o entre laboratorios se realizará de tal manera, que en caso de caída, no se produzcan salpicaduras. Lo recomendable es hacerlo en cajas herméticas o hieleras transportables. Éstas deberán ser rígidas y resistentes a los golpes, disponer de materiales absorbentes en su interior y de fácil desinfección.

Deberán estar rotuladas de forma oportuna y no podrán utilizarse para otros fines. Bajo ningún concepto se transportarán muestras en mano.

- Todo el personal debe poner especial cuidado en evitar el contacto de la piel con materiales potencialmente infecciosos. Para ello deben usarse guantes cuando se manipulen muestras o cultivos que contengan posibles patógenos.

Los guantes siempre serán desechados antes de salir del área de trabajo. Jamás se saldrá de la misma con los guantes puestos, ni se cogerá con ellos el teléfono, las peticiones, etc.

- Inmediatamente después de quitarse los guantes, se realizará un lavado de manos.
- Se usarán gafas protectoras y mascarillas faciales si existe riesgo de salpicaduras o aerosoles.
- Los derrames y accidentes serán informados inmediatamente al supervisor o jefe del laboratorio y se harán constar por escrito.
- Está rigurosamente prohibido pipetear con la boca.

- En la zona de trabajo no debe colocarse material de escritorio ni libros ya que el papel contaminado es de muy difícil esterilización.
- Es necesario disponer de autoclave.
- Las centrífugas deben ser de cierre hermético.

RECOMENDACIONES PARA LA PROTECCIÓN DEL PERSONAL DE LABORATORIO

- No se recomienda el uso de lentillas durante el trabajo en el laboratorio.
- Los guantes constituyen la medida de barrera más empleada para la protección de manos:
 - Sólo deben emplearse para protección contra riesgos biológicos y físicos (calor o frío), pero no para otras tareas (manejar volantes, teléfono, abrir puertas, etc.).
 - Las manos deben lavarse obligatoriamente al quitarse los guantes.
- La mascarilla sólo tiene utilidad para protección frente a polvo (partículas), aerosoles, gases y vapores químicos.
- La bata o pijama como vestuario de protección personal:
 - No debe salir fuera de su lugar de uso (cafetería, calle, etc.).
 - Nunca deben ser lavados fuera del recinto hospitalario.
 - No es aconsejable el empleo de ropa de calle que aumente la superficie corporal expuesta (pantalones cortos, sandalias, etc.).

DERRAME ACCIDENTAL

- Cubrir con un papel de filtro la zona afecta. Ello permite delimitar con claridad la extensión de superficie afecta por el derrame.
- Verter sobre del área afecta, con cuidado, hipoclorito a una concentración superior que la empleada para limpieza (diluida al 1:10). Dejar actuar 20 min. También puede emplearse compuestos de yodo.
- Con guantes retirar los desechos en un contenedor para material infeccioso.
- Enjuagar para evitar coloración residual.

RECOMENDACIONES PARA LA MANIPULACIÓN DE RESIDUOS

- Los recipientes para desechar los residuos de riesgo en el área de trabajo deben ser rígidos, de volumen inferior a 60 L, impermeables y resistentes a ácidos y álcalis, de cierre hermético para ser incinerados.
- El almacenamiento y transporte deberá hacerse en condiciones seguras. Deben existir zonas acotadas para su almacenamiento intermedio, especialmente si los residuos son de riesgo, no superando en ningún caso las 24 h una vez que se ha cerrado.
- Para los residuos no específicos se utilizarán bolsas de color diferenciadas.
- En el caso de objetos cortantes o punzantes deberán utilizarse recipientes rígidos, resistentes a la perforación cuyo volumen no supere los 2 L.

REFERENCIAS

1. Organización Mundial de la Salud. *Manual de Bioseguridad en el laboratorio*. 3a ed.
2. Ginebra 2005 ISBN 92 4 354650 3
3. Borrell N., Mesquida X., Alomar P. *Normas de seguridad: Capitulo 17* tomado de Micología Medica Asociación Española de Micología. 2007

VII. ACTIVIDADES PREVIAS A LAS PRÁCTICAS

El alumno:

- a. Deberá revisar previamente la práctica a realizar.
- b. Realizará la lectura complementaria que el profesor le indicará.
- c. Deberá obtener el material que se requiera para la práctica previamente solicitado por el profesor.

PRÁCTICA 1

INTRODUCCIÓN, IMPORTANCIA DE LAS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS EN LA CARRERA DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

INTRODUCCIÓN

El acelerado avance de la inmunología ha generado el desarrollo de técnicas que permiten resultados más precisos y de métodos de separación, tanto de componentes celulares como humorales, útiles en el diagnóstico. En este trabajo, se tiene como meta proveer las herramientas necesarias para entender estos avances, junto con los mecanismos implicados en el desarrollo de algunas técnicas de diagnóstico inmunológico e interpretación clínica.

¿Qué importancia tiene el laboratorio de inmunología para el médico veterinario?, primero tendríamos que definir cuál es el perfil del profesional. El médico veterinario zootecnista, es el profesional que aplica técnicas para incrementar la producción de alimentos de origen animal, salvaguardar la salud y bienestar animal a través del establecimiento de diagnósticos, tratamientos y prevención de enfermedades, evitando su trasmisión al ser humano; asimismo participa en la generación de investigación Biomédica y en lo relativo a la producción animal en diversos niveles.

La producción y el bienestar animal, para hacerse rentables, requieren la implementación de programas encaminados a fortalecer el control y la erradicación de las enfermedades infecciosas, es aquí donde el laboratorio de diagnóstico toma su importancia.

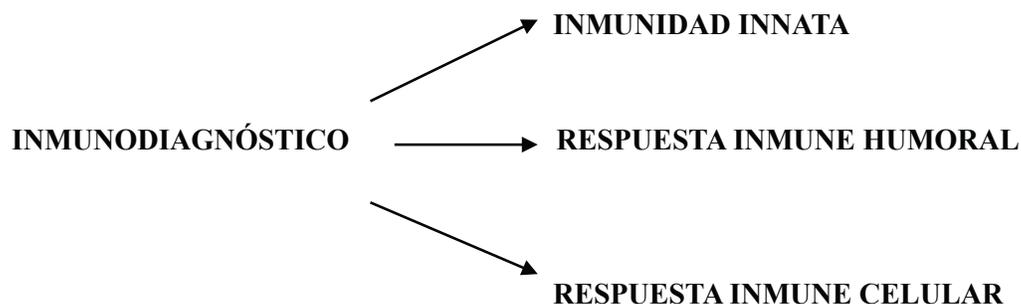
El laboratorio le permite al profesional, contar con las herramientas para establecer un diagnóstico (del griego **diagnostikos**, que significa: capaz de **distintuir o reconocer**) confiable y definitivo de los padecimientos que afectan a los animales. Para establecer el diagnóstico definitivo de alguna enfermedad, se pueden utilizar diversas metodologías como: la demostración mediante tinciones

apropiadas, el aislamiento en medios de cultivo específicos, y la identificación del agente etiológico mediante pruebas fisicoquímicas; ensayos virológicos y pruebas parasitológicas específicas. En algunas situaciones, como en el caso de enfermedades autoinmunes, no es posible realizar el aislamiento e identificación del agente, por lo que el diagnóstico se establece mediante otros parámetros, como son la detección de anticuerpos específicos, o el aumento del título de anticuerpos, la detección de reacción de los linfocitos T, o bien la detección del agente infeccioso por métodos inmunológicos o de biología molecular.

Conociendo el agente etiológico que está afectando a la granja, podemos establecer un programa adecuado de vacunación para controlar en una primera instancia la enfermedad, o implementar el tratamiento correcto.

Cuando un microorganismo penetra en un animal, el huésped lo reconoce como no propio. En primera instancia el huésped reacciona "activando" una serie de mecanismos innatos de defensa (secreciones y fagocitosis entre otros), que actúan como barreras de respuesta primaria; En respuesta al reconocimiento del microorganismo (antígeno), el huésped reacciona produciendo anticuerpos, proteínas del suero, capaces de interactuar con determinados sitios del microorganismo, que tenderán a intervenir en su evolución hasta erradicarlo. En este proceso de reconocimiento y de generación de respuesta, el organismo también genera la activación de células especiales como las células NK, los linfocitos T y los linfocitos B; algunos actúan sobre las células infectadas, otros reaccionan directamente en contra del microorganismo y otros cooperan para la formación de anticuerpos.

El objetivo es, por lo tanto, lograr que un animal sea inmune a una infección, este estado se logra gracias a mecanismos involucrados en la respuesta inmune del individuo, que pueden clasificarse en:



El diagnóstico inmunológico se basa en el hecho de que la respuesta inmune de un animal hacia los diferentes agentes infecciosos, en general, es específica. Por este motivo se han utilizado los anticuerpos o linfocitos sensibilizados para determinar si el animal está infectado o ha estado en contacto con los antígenos de los agentes, tales como bacterias, virus, hongos, parásitos, alérgenos, etc.

Se llama serología a la ciencia de la detección de anticuerpos específicos en los líquidos corporales. Las pruebas serológicas pueden clasificarse en tres categorías principalmente:

PRUEBAS DE UNIÓN PRIMARIA

Se realizan al combinar antígenos y anticuerpos y luego medir las cantidades de complejos inmunes formados. Suelen utilizarse radioisótopos, colorantes fluorescentes o marcadores enzimáticos para identificar a algunos de los reactivos. Después de obtener el equilibrio de la reacción, los complejos inmunes se separan del material no combinado y se determina la cantidad de marcador presente en estos.

PRUEBAS DE UNIÓN SECUNDARIA

Se trata de pruebas de dos etapas. La primera consiste en la interacción entre el antígeno y el anticuerpo, reacción que se realiza mediante uniones covalentes. La segunda etapa queda determinada por el estado físico del antígeno. Así, los anticuerpos se combinan con antígenos solubles, en soluciones con condiciones apropiadas, los complejos precipitan ó difunden en el medio formando líneas de precipitación que son visibles. Si los antígenos, son partículas (por ejemplo bacterias o eritrocitos) entonces se aglutinan formando un conjunto de grumos finos o gruesos.

En otras circunstancias, la combinación de antígeno y anticuerpo puede llevar a la activación del sistema del complemento, circunstancia que también puede detectarse y medirse.

PRUEBAS DE UNIÓN TERCIARIA

Cabe señalar que estas pruebas no son serológicas. Cuando el reconocimiento del antígeno por el anticuerpo o el linfocito sensibilizado ocurre in vivo, pueden presentarse manifestaciones visibles generalmente de tipo inflamatorio.

Estas reacciones se denominan de hipersensibilidad y pueden ser de tipo temprano (I y II) o de tipo tardío (IV) según el tiempo que tardan en aparecer, además son la base de las pruebas intradérmicas para el diagnóstico.

La validez de la prueba diagnóstica evaluada se mide por medio de los parámetros "Sensibilidad" (**S**) y "Especificidad" (**E**).

SENSIBILIDAD

Este término tiene dos connotaciones:

- a) Probabilidad que un animal realmente enfermo sea detectado como tal por la técnica o también definida como la proporción de animales realmente enfermos y que la técnica ha detectado como tales.
- b) La prueba tiene la capacidad de reconocer niveles bajos de anticuerpos.

ESPECIFICIDAD

Probabilidad de que un animal realmente sano sea detectado como tal por la técnica o la proporción de animales realmente sanos y que la técnica ha detectado como tales.

Cuadro 3

CANTIDAD MÍNIMA DE PROTEÍNAS (ANTICUERPOS) QUE PUEDE DETECTARSE
POR ALGUNAS PRUEBAS INMUNOLÓGICAS

PRUEBAS	PROTEÍNA ($\mu\text{l/ml}$)
Pruebas de unión primaria	
ELISA	0.0005
Radioinmunoanálisis competitivo	0.00005
Pruebas de unión secundaria	
Precipitación en gel	30
Precipitación en anillo	18
Aglutinación bacteriana	0.05
Hemaglutinación pasiva	0.01
Inhibición de la hemaglutinación	0.005
Fijación del complemento	0.05
Neutralización vírica	0.00005
Actividad bactericida	0.00005
Neutralización de antitoxina	0.06

En este trabajo, se cubren las expectativas del programa de prácticas dentro del laboratorio de inmunología veterinaria que actualmente se imparte en la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, tomando en cuenta que existen algunas prácticas, sólo se abordarán de manera teórica, sin que esto afecte los objetivos generales de la materia, ya que tomarán en cuenta los procedimientos y aspectos normativos que aplican para los procedimientos de laboratorio.

OBJETIVO

Que el alumno adquiera los fundamentos y la metodología para la interpretación y la valoración de las pruebas de diagnóstico comúnmente utilizadas en la práctica veterinaria.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Tizard Ian R, Introducción a la Inmunología Veterinaria. 10ª edición.
Elsevier Saunders, 2009.

PRÁCTICA 2

LOS ANIMALES DE LABORATORIO

INTRODUCCIÓN

Los animales han sido utilizados por el hombre desde tiempos de la prehistoria de diferentes formas y con ellos se han llevado a cabo diferentes estudios e investigaciones.

En las investigaciones biomédicas se precisa la utilización de animales de laboratorio como bio-modelos para comprender la fisiopatología de las diversas enfermedades. El uso de animales de laboratorio facilitó el desarrollo de diversas vacunas que se aplican en humanos o animales.

Dentro del laboratorio de Inmunología se precisa entender y comprender la forma de realizar el diagnóstico de las enfermedades, haciendo uso de sueros y anti-sueros sanguíneos.

Se define como animal de laboratorio todo aquel individuo que tras ser sometido a un experimento o investigación revela resultados que se pueden analizar, confirmar y de esta forma ser veraces.

Los animales de laboratorio se pueden clasificar de diferentes formas, y en esta ocasión la clasificación que vamos a considerar se basa en la microbiota que presenta el animal de laboratorio.

OBJETIVO

Que el alumno entienda la importancia del uso de animales dentro de un laboratorio y aprenda el manejo correcto para inocular al reactivo biológico.

Conozca y aplique dentro de su competencia en base a la norma: **NOM-062-ZOO-1999**. "Especificaciones Técnicas para la Producción, Cuidado y Uso de los animales de laboratorio."

Que aprenda el manejo de animales de laboratorio y su aplicación en Inmunología Veterinaria, desde su inmunización hasta la obtención de sangre y/o suero para la evaluación de los anticuerpos producidos.

CLASIFICACIÓN MICROBIOLÓGICA

Los animales de laboratorio se pueden clasificar microbiológicamente en:

Animal Axénico. Animal obtenido por cesárea justo antes de su nacimiento, amamantado y criado en un ambiente totalmente estéril y que son libres de microorganismos demostrables (microbiota).

La comida, el agua, el aire, las jaulas y el equipo se deben de esterilizar. Los técnicos encargados de su mantenimiento utilizan ropa especial y estéril para evitar la contaminación de los animales.

Animal Gnotobiótico. Aquellos que están completamente libres de agentes patógenos o que pueden hospedar uno o más microorganismos claramente identificados.

Animal Libre de Patógenos Específicos (SPF). Animal libre de vida patógena específica asociada. Esta adición se asegura mediante la aplicación de pruebas microbiológicas específicas para los microorganismos que no deben estar presentes.

Animal Convencional. Animal con carga microbiana desconocida e incontrolada, son todos aquellos animales criados bajo condiciones ambientales normales no controladas.

ANIMALES MÁS UTILIZADOS EN EL LABORATORIO

Estos son: ratón, rata, conejo, cobayo, hámster, gerbo, gato, perro y aves.

Los animales que se van a utilizar deben ser seleccionados en base a las características y necesidades de la investigación que se va a realizar. Es decir considerar la

especie, edad, sexo, estado fisiológico y sobre todo se debe trabajar con animales sanos, manteniéndolos en las mejores condiciones sanitarias, con instalaciones y alimentación adecuadas.

Algunas de las desventajas en el uso de algunos animales es su costo elevado, la limitación del espacio para jaulas y los diversos materiales, la infección cruzada entre animales y el riesgo de zoonosis y/o antropozoonosis.

RATÓN

Para un proceso experimental, el ratón es un organismo modelo que ofrece muchas ventajas con respecto a otros modelos genéticos como la rata, el conejo y el cobayo.

Las ventajas en el uso del ratón son: que es un mamífero pequeño, gran parte de sus procesos bioquímicos son similares en el hombre. Tienen un tiempo generacional muy corto, son muy prolíficos, se adaptan fácilmente a la vida del bioterio, lo que permite controlar las variables ambientales durante la experimentación; de los mamíferos es la especie mejor estudiada desde el punto de vista genético.

Sujeción: Tomándolo por la base de la cola Fig. 1, saque el ratón de la jaula y apóyelo sobre una superficie rugosa contra la que pueda ejercer resistencia Fig. 2. Sin soltarlo, tome en forma suave y firmemente la cola entre el dedo meñique y la palma de la mano Fig. 3 y luego sujete la piel del cuello con los dedos índice y pulgar Fig. 4. Levante el animal Fig. 5.

Nota: Tenga especial cuidado con los ratones agresivos, ya que pueden darse vuelta y morder a quien los está manipulando.



Figura 1. Extraer al ratón por la cola.



Figura 2. Dejar que se sujete a la jaula.



Figura 3. Sujetar al ratón por la cola.



Figura 4. Tomar la piel del cuello.



Figura 5. Levantar al animal.

Ya puede proceder a manipularlo para realizar alguna inoculación, sangrado o bien eutanasia

RATA

Sujeción: Se utilizan dos formas de sujetar a una rata:

1. Sujetar al animal de la base de la cola Fig. 6, procurando hacerlo sólo por lapsos muy cortos, ya que se pueden estresar o impacientar e intentar morder al manipulador.

2. Apoye la palma de la mano sobre el lomo del animal Fig. 7, colocando el dedo índice y medio a ambos lados de la mandíbula, de forma que la cabeza de la rata quede entre dichos dedos, impidiendo su movimiento Figs. 8 y 9.



Figura 6. Sujeción por la cola.



Figura 7. Sujeción del dorso.



Figura 8. Sujeción de dorso y cuello.



Figura 9. Inmovilización.

Levanta al animal sujetándolo firmemente, realizando una leve presión debajo de la mandíbula de la rata para prevenir mordeduras Fig. 10 Con la otra mano tome la parte posterior del cuerpo, levantándolo de la base de la cola para exponer el abdomen del animal. Fig. 11.



Figura 10. Levantar al animal.



Figura 11. Exposición del abdomen.

3. Otra forma de sujeción se llama de Jareta: tomar la rata apoyando la mano alrededor del tórax Fig. 12, quedando una de las patas entre sus dedos índice y medio y la otra sobre su dedo pulgar (con el dedo índice realice una presión leve sobre la mandíbula de la rata, para prevenir mordeduras) Fig. 13. Con la otra mano, tome la parte posterior del cuerpo y levántela, sujetándola firmemente.



Figura 12. Sujetar por el tórax.



Figura 13. Sujeción de jareta.

CONEJO

Sujeción: También en el caso del conejo existen diferentes formas de sujeción, sólo explicaremos algunas de ellas:

1. Tome con una mano un pliegue de la piel del cuello y el dorso Fig.14, apoye sobre la otra mano las patas traseras Fig. 15, levántelo de modo que el peso del conejo esté sobre su mano izquierda Fig. 16. Una vez que esté bien sujeto, ya se puede llevar acabo el manejo o revisión del animal Fig. 17.

La sujeción incorrecta puede llevar a la producción de luxaciones e incluso a fracturas de columna vertebral.



Figura 14. Sujeción del dorso y cuello.



Figura 15. Sujeción con ambas manos.



Figura 16. Levantar al animal.



Figura 17. Exposición del animal.

2. Para transportarlos en trayectos más largos debe colocarse el cuerpo del animal sobre el antebrazo del operador Fig. 18, con la cabeza dirigida hacia el codo quedando ésta y los ojos tapados (debajo del brazo) Fig. 19. Para mayor confort del animal, con el dedo índice y medio, se sujetará suavemente los genitales del conejo al trasladarlo Fig. 20.



Figura 18. Colocar al animal sobre el antebrazo.



Figura 19. Dejar la cabeza del animal en el brazo.



Figura 20. Sujetar por debajo de los genitales del animal.

VÍAS DE INOCULACIÓN

Para aplicar correctamente una sustancia es importante conocer las diferentes vías que existen y estas son las siguientes:

Intracerebral, intramuscular Fig. 21, intradérmica, subcutánea Fig. 22, intrapleural, ocular, nasal, oral Fig. 23, y por escarificación.

Es importante considerar la cantidad de inóculo que se va a aplicar, dependiendo de la especie, edad y vía de inoculación.

Siempre se debe realizar la asepsia del área donde se va a realizar la inoculación.



Figura 21. Intramuscular (rata).



Figura 22. Inoculación subcutánea.



Figura 23. Inoculación vía oral.

Cuadro 4
VÍAS DE ADMINISTRACIÓN DE FLUIDOS Y SUSTANCIAS

ANIMAL	VENA AURICULAR	VENA CAUDAL	VENA CEFÁLICA	VENA FEMORAL	* VENA PENEANA	VENA SAFENA	* VENA SUBLINGUAL	* VENA YUGULAR
Rata	-	+	-	-	+	+	+	+
Ratón	-	+	-	-	-	-	-	-
Jerbo	-	-	-	-	-	-	+	-
Hámster	-	-	-	-	-	-	-	+
Cuyo	-	-	-	+	+	+	+	+
Conejo	+	-	-	-	-	-	-	-
Perro	-	-	+	+	-	+	+	+
Gato	-	-	+	+	-	+	+	+
Porcino	+	-	-	-	-	-	+	-
Primates no-humanos	-	-	+	+	-	+	+	+

* Previa anestesia o sedación

+ Permitido

- No permitido

Referencia NOM-062-ZOO-1999

VÍAS DE EXTRACCIÓN SANGUÍNEA

Los vasos sanguíneos utilizados son diferentes dependiendo de la especie con la que se está trabajando. Los más utilizados son la vena yugular, safena, radial, coccígea, mamaria, tarsal. También se puede obtener sangre directamente de corazón.

El corazón normalmente se sitúa en el tórax en la punta del codo en la mayoría de las especies y puede sentirse o escucharse con un estetoscopio. Si el procedimiento no es con fines terminales para el animal (por ejemplo, cuando se sangra a un mamífero sin cola) entonces se deben observar precauciones asépticas. Cualquier suciedad o residuo que pueda contaminar la muestra tendrá que ser retirada en primera instancia.

Siempre se debe limpiar y desinfectar previamente el área donde se va a realizar la extracción de sangre Fig. 24.



Figura 24. Asepsia en la zona a puncionar.

Las agujas para la punción cardíaca deben ser suficientemente largas para penetrar en el ventrículo.

Para un solo sangrado (con la recuperación subsecuente) en animales pequeños, una aguja de 25 mm x 21-23 G será suficiente. Para otros animales el tamaño de la aguja será aumentado en relación con el tamaño del animal. La punción cardíaca para la obtención de sangre en animales de mayor tamaño como: conejos, probablemente se llevará mejor a cabo con una aguja de 25-50 mm x 18 G acoplada a una jeringuilla de 10 o 20 ml. También es útil tener una o dos jeringas extras listas que puedan ser acopladas rápidamente a la aguja.

Es común utilizar este método para sangrías totales, pero también es útil para obtener muestras únicas de sangre en conejos, ratas, ratones, cobayas, hámsteres y ocasionalmente en los hurones.

Cuadro 5
VIAS DE ADMINISTRACION DE FLUIDOS Y SUSTANCIAS

ANIMAL	VENA AURICULAR	VENA CAUDAL	VENA CEFALICA	VENA FEMORAL	*VENA PENEANA	VENA SAFENA	*VENA SUBLINGUAL	*VENA YUGULAR
Rata	-	+	-	-	+	+	+	+
Ratón	-	+	-	-	-	-	-	-
Jerbo	-	-	-	-	-	-	+	-
Hamster	-	-	-	-	-	-	-	+
Cuyo	-	-	-	+	+	+	+	+
Conejo	+	-	-	-	-	-	-	-
Perra	-	-	+	+	-	+	+	+
Gato	-	-	+	+	-	+	+	+
Porcino	+	-	-	-	-	-	+	-
Primates no-humanos	-	-	+	+	-	+	+	+

- * Previa anestesia o sedación
- Permitido
- No permitido

Referencia NOM-062-ZOO-1999

Cuadro 6
VIAS DE ADMINISTRACION DE FLUIDOS Y SUSTANCIAS

ANIMAL	VENA AURICULAR	VENA CAUDAL	VENA CEFALICA	VENA FEMORAL	*VENA PENEANA	VENA SAFENA	*VENA SUBLINGUAL	*VENA YUGULAR
Rata	-	+	-	-	+	+	+	+
Ratón	-	+	-	-	-	-	-	-
Jerbo	-	-	-	-	-	-	+	-
Hamster	-	-	-	-	-	-	-	+
Cuyo	-	-	-	+	+	+	+	+
Conejo	+	-	-	-	-	-	-	-
Perra	-	-	+	+	-	+	+	+
Gato	-	-	+	+	-	+	+	+
Porcino	+	-	-	-	-	-	+	-
Primates no-humanos	-	-	+	+	-	+	+	+

- * Previa anestesia o sedación
- Permitido
- No permitido

Referencia NOM-062-ZOO-1999

Cuadro 7

VIAS DE OBTENCION DE SANGRE

ANIMAL	*CORAZON	SENO ORBITAL	VENA AURICULAR	VENA CAUDAL	* VENA CAVA ANTERIOR
Rata	+	+	-	+	-
Raton	+	+	-	+	-
Jerbo	+	+	-	-	-
Hámster	+	+	-	-	-
Cuyo	+	-	+	-	-
Conejo	+	-	+	-	-
Perro	+	-	-	-	-
Gato	+	-	-	-	-
Porcino	-	+	+	-	+
Primates no humanos	-	-	-	-	-

* Previa anestesia o sedación
 + Permitido
 - No permitido



Figura 25. Se coloca decúbito dorsal y se introduce una larga aguja a 45° justo debajo del esternón hasta el corazón.



Figura 26. La aguja deberá ser suficientemente larga para penetrar en el ventrículo y se debe mantener un vacío en la jeringuilla durante la entrada de la aguja.



Figura 27. Si se ha tenido éxito en la punción, la sangre aparecerá en la jeringuilla.



Figura 28. Se obtiene lentamente la sangre.

Cuadro 8
VÍAS DE EXTRACCIÓN DE SANGRE

ANIMAL	* VENA CAVA POSTERIOR	VENA CEFALICA	VENA FEMORAL	VENA SAFENA	* VENA YUGULAR
Rata	-	-	+	-	-
Ratón	-	-	-	-	-
Jerbo	-	-	-	-	-
Hámster	-	-	-	-	-
Cuyo	+	-	-	-	-
Conejo	+	-	-	-	-
Perro	-	+	+	+	+
Gato	-	+	+	+	+
Porcino	-	+	+	-	+
Primates no humanos	-	+	+	+	+

* Previa anestesia o sedación
+ Permitido
- No permitido

NOM-062-ZOO-1999

PUNCIÓN INTRACARDIACA EN EL RATÓN



Figura 29. Inicialmente se anestesia al animal y se inmoviliza firmemente a una superficie en decúbito dorsal.



Figura 30. Aplicar antiséptico en la región abdominal para posteriormente introducir la aguja dirigida hacia el corazón.



Figura 31. Efectuar la extracción hemática.



Figura 32. Una vez obtenido el volumen sanguíneo, se extrae la aguja con mucho cuidado y se realiza una pequeña compresión con una torunda impregnada de alcohol para efectuar la asepsia.

PUNCIÓN INTRACARDIACA EN EL CONEJO

Se inmoviliza, se le anestesia y se coloca en decúbito dorsal

Rasurar la porción ventral del tórax y aplicar antiséptico previo a la punción

Tomando como referencia al esternón y formando un ángulo imaginario de 45° por debajo de la apófisis xifoidea y con dirección craneal.



Figura 33. Introducir la aguja.



Figura 34. Efectuar la extracción sanguínea.

Punción en la vena marginal de la oreja

Inmovilizar al conejo, sujetándolo con una toalla (enrollando todo su cuerpo con cuidado, incluyendo las patas).

Introducir al conejo en una caja, jaula o algún instrumento diseñado para este fin).



Figura 35. Inmovilización del conejo.



Figura 36. Ubicación de la vena marginal y rasurar la piel sobre la vena marginal.



Figura 37. Aplicar antiséptico, con una torunda impregnada de alcohol al 70% o benzal quirúrgico.



Figura 38. Introducir la jeringa, formando un ángulo imaginario de 45° con la piel.



Figura 39. Jalar lentamente el embolo de la jeringa y obtener lentamente el volumen sanguíneo.

OTRAS VÍAS

Rata

Extracción de sangre a través de la vena lateral de la cola

La técnica es similar en los ratones.



Figura 40. Se efectúa por medio físico de contención adecuado o bajo efecto de anestésicos. Es necesaria luz apropiada.



Figura 41. Se frota la cola con agua a 40°- 45 °C, seguido de un desinfectante, secando posteriormente con algodón en la región donde se puncionará.



Figura 42. La extracción se realiza con jeringa de 1 ml y una aguja de 25 G a 27 G. Las venas se visualizan dorsal como lateralmente, la aguja se introduce en la porción distal de la cola con el bisel hacia arriba. Si ocurre alguna hemorragia subcutánea es conveniente cambiar el sitio de punción.



Figura 43. Se procede a la extracción de la sangre lentamente, una vez terminado se lleva a cabo la compresión con un algodón con antiséptico.

Nota: Por ser algo complicada esta técnica requiere de práctica.

Por lo anteriormente expuesto es importante saber reconocer cuando sí es necesario el uso de animales de laboratorio, y estamos obligados a mantenerlos en las mejores condiciones sanitarias, de alimentación, con el mínimo de stress y de ser necesario aplicar en forma correcta la eutanasia. No debemos olvidar que los animales también sienten, aun cuando no se pueden quejar.

La selección del método o forma de eutanasia y el agente que será utilizado necesita ser tomado en consideración de acuerdo con la naturaleza y requerimientos del estudio experimental. Es absolutamente necesario seleccionar un método que cause el menor sufrimiento a los animales.

Eutanasia: Procedimiento humanitario empleado para terminar con la vida de los animales de laboratorio, sin producirles dolor, angustia o sufrimiento. Lo que significa "**A BIEN MORIR**"

Cuadro 9

Cuadro 9 APLICACION DE LOS AGENTES Y METODOS DE EUTANASIA

ANIMALES	METODOS RECOMENDADOS	METODOS ACEPTADOS CONDICIONALMENTE
Roedores y otros animales pequeños	Anestésicos inhalables, CO ₂ , Ar, N ₂ irradiación con microondas, barbitúricos	N ₂ , Ar, dislocación cervical, decapitación
Conejos	Anestésicos inhalables CO ₂ , barbitúricos	N ₂ , Ar, dislocación cervical, decapitación, pemo cautivo penetrante
Perros	Anestésicos inhalables, CO ₂ , barbitúricos	N ₂ , Ar, electrocución, pemo cautivo penetrante
Gatos	Anestésicos inhalables, CO ₂ , barbitúricos	N ₂ , Ar
Primates	Barbitúricos	Anestésicos inhalables, CO ₂ , N ₂ , Ar
Porcinos	CO ₂	Pinzas eléctricas seguido de sangrado inmediato. Pistola de pemo cautivo, seguido de sangrado inmediato (se deben utilizar cartuchos apropiados).
Todas las especies		Exanguinación

NOM-062-ZOO-1999

N² (Nitrógeno)

Ar (Argón)

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Las jeringas serán canalizadas al contenedor destinado para su almacenamiento y posterior eliminación según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

Las torundas con contenido hemático en una bolsa "Amarilla", la cual se envía al incinerador de la facultad para su eliminación.

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1. Explica cuál es la importancia de la utilización de los animales de laboratorio en la Inmunología
2. Describa las instrucciones generales para inocular a los animales.
3. ¿Cuáles son los animales de laboratorio comúnmente utilizados?
4. Describir los métodos de la obtención de sangre en las siguientes especies:
a) Conejo b) Rata c) Ave
5. Realice un cuadro diferencial de acuerdo a la clasificación microbiológica de los animales de laboratorio.

GLOSARIO

Anestesia: Ausencia de conciencia y sensibilidad. Estado de inconsciencia inducido, en el que el individuo no percibe dolor, ni tiene conciencia de lo que ocurre.

Asepsia: Ausencia de gérmenes.

Caudal (o distal): Se refiere a la ubicación más próxima a la cola. Es una valoración relativa.

Craneal: Se refiere a la ubicación más próxima a la cabeza. Es una valoración relativa.

Decúbito: posición del animal apoyando su región ventral, lateral o dorsal sobre la superficie de trabajo.

Distal (caudal): Ubicación más alejada en relación a la cabeza.

Dorsal: Opuesto a ventral. Ubicado sobre la mitad superior del cuerpo, más cerca de la columna vertebral, considerando la posición cuadrúpeda

Sedación: Relajación, disminución de la reactividad del individuo. Se logra por métodos químicos.

Ventral: Opuesto a dorsal. Ubicado sobre la mitad inferior del cuerpo, considerando la posición cuadrúpeda.

BIBLIOGRAFÍA

SAGARPA: Norma Oficial Mexicana para la Producción, Cuidado y Uso de los Animales de Laboratorio. NOM-062-ZOO-1999.

Extracción de Sangre en los Mamíferos y Aves de Laboratorio PRIMER INFORME DEL GRUPO CONJUNTO DE TRABAJO BVA/FRAME/RSPCA/UFAW SOBRE *EL REFINAMIENTO* Artículo original en Inglés publicado en *Laboratory Animals* (1993) 27, 1-22.

Guía para el cuidado y uso de los animales de laboratorio, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences National Research Council, Edición Mexicana auspiciada por la Academia Nacional de Medicina México, D.F. 2002

Klaunberg BA, O'Malley J, Clark T, Davis JA. Euthanasia of Mouse Fetuses and Neonates. Contemp Top Lab Anim Sc 2004, 43:(5) 29-34.

AVMA Guidelines on Euthanasia. June 2007 [http://www.avma.org/resources/euthanasia.pdf]

A Volume in The Laboratory Animal Pocket Reference Series, "The Laboratory RAT, Patrick E. Sharp, D.V.M, Marie C. La Regina , D.V.M.,MS 1998

Oteiza, F.J. Manejo de los animales Textos Universitarios 1ª Edición, 1979.

Lépine, Pierre, Manuel des inoculations et prèvelevants chez les aniamaux del Laboratoire Ed. Masson 1964

Exotic Small Mammal Care and Husbandry, Ron E. Banks, DVM, DACLAM, DACVPM, CPIA, Julie M. Sharp, DVM, Sonia D. Doss, M.Ed., RLATG, Deborah A.

Vanderford, DVM, Editorial Wiley Blackwell, Primer publicación 2010.

Ciencia y Tecnología en protección y experimentación animal, Jesús M. Zúñiga, Ed. Mc Graw Hill-Interamericana (2001).

Refinando los procedimientos para la administración de sustancias - Edición en español. Report of the BVA/AFW/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement, Laboratory Animals (2001), Vol. 35, p.1-41

PRÁCTICA 3

DILUCIONES

INTRODUCCIÓN

Una dilución es la disminución de la concentración de una sustancia en una solución. Esta práctica es muy común en los laboratorios y de ella depende en gran parte el resultado final analítico que se obtenga. En el laboratorio de Inmunología nos permite determinar, entre otros, la presencia y concentración de anticuerpos o antígenos, lo cual se puede correlacionar con la situación clínica o bien la eficacia de una vacunación.

Las diluciones generalmente se expresan como una proporción, por ejemplo: 1:10 (o 1/10), lo que indica que contamos con 1 parte de la solución original o soluto más 9 del solvente. De esta forma disminuimos la concentración 10 veces. El factor de dilución representa el número de veces que fue diluida la solución concentrada, en este caso es de 10.

Una dilución indica una proporción sin importar el volumen en que se encuentra, así, una dilución 1:4 podrá estar en 0.5 ml, en 20 ml, en 1 litro, etc. Indicando que una de las cuatro partes finales (volumen total) corresponde al soluto.

La dilución, en este caso, se lleva a cabo en un solo paso desde la solución original hasta la solución final por lo que se conoce como dilución directa.

Las diluciones seriadas son también muy útiles en pruebas de rutina clínica e investigación. Estas diluciones son aquellas en las cuales se parte de una solución concentrada y se va diluyendo en forma secuencial, cada una a partir de la anterior, manteniendo constante el factor de dilución.

A diferencia de las diluciones directas que nos proporcionan resultados cuantitativos, estas últimas nos proporcionan resultados semi-cuantitativos por la gran cantidad de pasos que contiene, sin embargo, nos permite manejar una gran cantidad de concentraciones de forma rápida y sencilla.

Para reacciones serológicas es frecuente utilizar diluciones dobles, triples, cuádruples, décuples, etc.

Cuadro 10
TIPOS DE DILUCIONES

Base	Proporción soluto: solución	Soluto: Solvente
Dos	1:2	1+1
Tres	1:3	1+2
Cuatro	1:4	1+3
Diez	1:10	1+9

Las diluciones en base 10 se expresan generalmente en forma logarítmica decimal de la siguiente manera:

Cuadro 11

DILUCIÓN SERIADA LOGARÍTMICA DECIMAL				
1	2	3	4	5
1:10	1:100	1:1000	1:10000	1:100000
ó	ó	ó	ó	ó
10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}

Cuando se requiere conocer la concentración de anticuerpos en un suero o en cualquier otro biológico, se hace uso de las titulaciones. Estas últimas se realizan con diluciones seriadas donde la concentración del soluto va disminuyendo sucesivamente. El título corresponde a la última dilución que da una reacción positiva. De acuerdo a lo anterior, un suero con un título 1:20 contiene menos anticuerpos que uno con un título de 1:500. Lo anterior correlaciona en muchas ocasiones con la sintomatología en una infección.

OBJETIVO

El alumno conocerá y aplicará las diferentes metodologías para llevar a cabo cualquier dilución e interpretará las concentraciones de dichas diluciones.

MATERIAL

REACTIVOS Y SOLUCIONES

- Agua (diluyente)
- Agua con colorante (soluto)

EQUIPO

- Micropipetas y puntas de diferente volumen
- Microplaca de diluciones

DIVERSO

- 10 Tubos de ensaye
- Gradilla
- Propipeta
- 1 Pipeta serológica de 1 ó 2 ml
- 1 Pipeta serológica de 5 ó 10 ml

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1.- Partir de una dilución inicial (1:1) y preparar una dilución doble de la siguiente forma:

- Colocar en 10 tubos de ensaye 1 ml del diluyente (Fig. 44)
- Colocar en el primer tubo 1 ml del soluto
- Transferir del primer tubo al segundo tubo 1 ml de la solución (esto corresponde al volumen de transferencia)
- Repetir el paso anterior hasta el último tubo
- Del tubo 10 eliminar 1 ml de la solución (Fig. 45)



Figura 44. Colocar solvente a los tubos y soluto al primero.

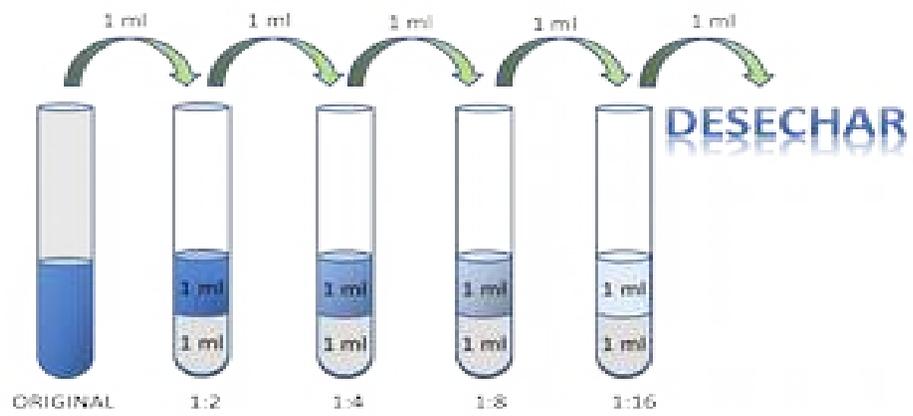


Figura 45. Desarrollo de la dilución doble.

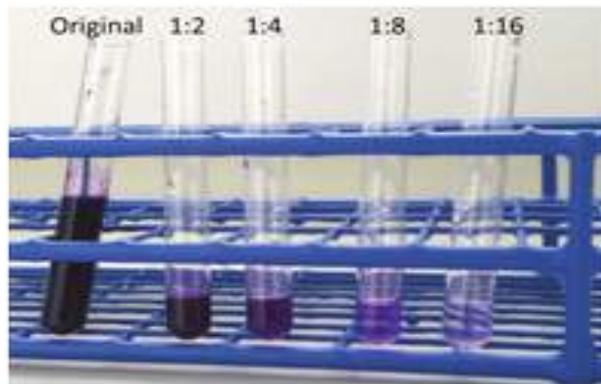


Figura 46. Efecto de la dilución en el colorante.

2.- Preparar una dilución logarítmica o decimal (1:10)

- Colocar en 10 tubos de ensaye el diluyente, 9 ml a cada tubo
- Colocar en el primer tubo 1 ml del soluto
- Transferir del primer tubo al segundo tubo 1 ml de la solución (esto corresponde al volumen de transferencia)
- Repetir el paso anterior hasta el último tubo
- Del tubo 10 eliminar 1 ml de la solución

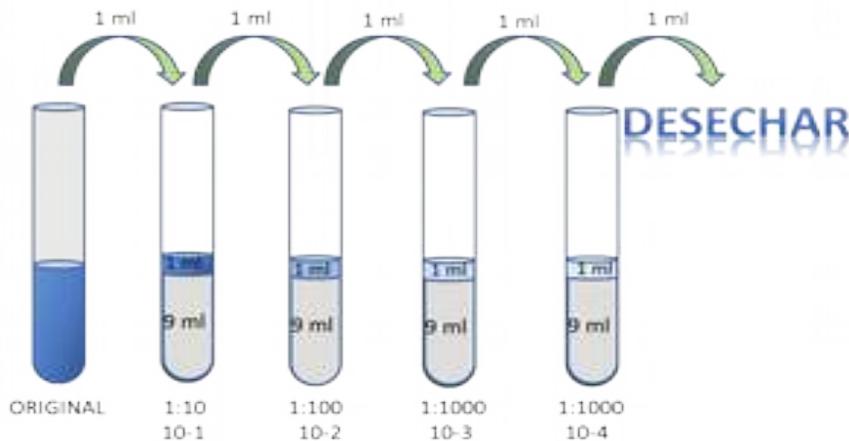


Figura 47. Desarrollo de la dilución decimal.

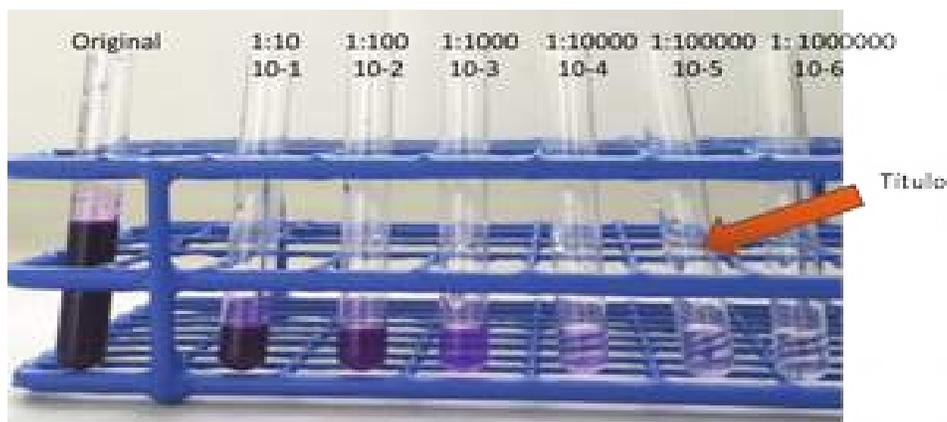


Figura 48. Fin de la dilución.

Nota: El título se aprecia en el último tubo donde se observa la reacción visible (Ej. 1×10^5)

Con los pasos anteriores se pueden preparar diferentes diluciones, por ejemplo:

Para una dilución triple (1:3), en un volumen total de 6 ml se requiere 1/3 del volumen, es decir, un volumen de transferencia de 2 ml.

Para una dilución quíntuple (1:5) en un volumen total de 6 ml se requiere 1/5 del volumen, es decir, un volumen de transferencia de 1.2 ml.

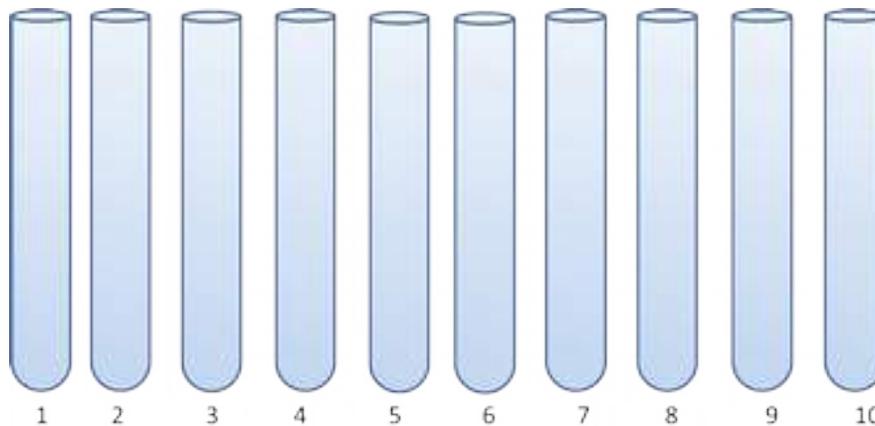
RESULTADOS

Ilustra en cada tubo la diferencia de color de las diluciones realizadas.

Anotar en los cuadros 12 y 13 la concentración de cada tubo.

Dilución 1:2

Esquema 1



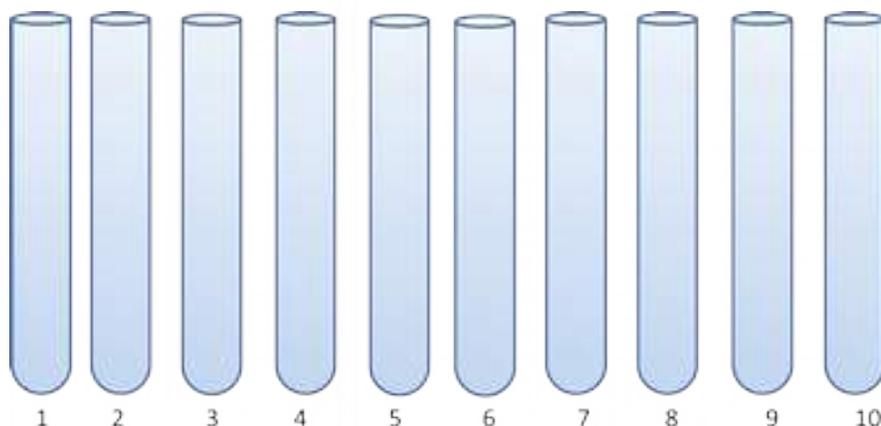
Cuadro 12

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración										

Volumen de transferencia= _____ ml. Título = _____

Dilución 1:10

Esquema 2



Cuadro 13

TUBO	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Concentración										

Volumen de transferencia= _____ ml. Título = _____

TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE RESIDUOS

El contenido de los tubos serán depositados en un contenedor destinado al almacenamiento de estos, hasta su canalización a la empresa contratada por la Universidad para este fin.

Las puntas de la micropipeta, las pipetas y los tubos vacíos se colocarán en un recipiente el cual contendrá cloro al 1% para la inactivación de los mismos y su posterior esterilización y posible reciclado.

Los procedimientos de eliminación de los residuos se realizan según la norma oficial mexicana NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1.- ¿Cuál es la importancia de saber realizar diluciones en inmunología?

2.- ¿Para qué será importante conocer el título de Anticuerpos o Antígenos dentro de una muestra?

3.- El que un animal presente un título elevado de anticuerpos será indicativo de que el animal está enfermo o vacunado, ¿sí o no y porque? Fundamenta tu respuesta.

4.- Investiga en que pruebas inmunológicas se aplican las diluciones de suero.

BIBLIOGRAFÍA

Manual de laboratorio para preparación de soluciones. MVZ Laura Patricia Noé M. OIRSA Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria) 2009

Molecular. Objetivos del curso y manual de prácticas de laboratorio. Mc Graw-Hill Interamericana Editores, México, 2000.

Guzmán Verri Caterina. Manual de prácticas de Laboratorio de Bioquímica. Universidad Nacional Facultad de Ciencias de la Salud. Escuela de Medicina Veterinaria. Cátedra de Bioquímica. Costa Rica. 2010

Manual de Métodos Inmunológicos. Universidad de Costa Rica. Facultad de Microbiología. Instituto Clodomiro Picado. Lomonte Vigliotti Bruno. Cuarta Edición. 2007

Norma oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1985, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales.

NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

PRÁCTICA 4

DETERMINACION DE GAMMAGLOBULINAS EN BECERRO NEONATO

INTRODUCCIÓN

Las becerras son el futuro de cada rancho, por lo tanto deberán ser protegidas en forma natural desde el nacimiento a través del consumo de calostro durante las primeras 48 hrs. Debido a que en las especies de placentación completa (vaca, yegua, cerda, oveja), no hay pasaje de anticuerpos (Acs) por esta vía, es importante el consumo de calostro durante las primeras horas de vida. Ocasionalmente no ingieren la cantidad adecuada de calostro y presentan deficiente nivel de inmunoglobulinas. Esta es una etapa crítica con una elevada morbilidad y mortalidad que se presenta en los becerros en el período comprendido entre el nacimiento y el destete, por lo tanto si no se recibe alguna ayuda inmunológica, el animal recién nacido puede sucumbir rápidamente ante microorganismos como *Escherichia coli*, *Salmonella sp*, *Coccidias*, *Cryptosporidium* y *Coronavirus* fundamentalmente

El sistema inmunitario del feto aunque funcional, no es estimulado, y no sintetiza por lo tanto inmunoglobulinas.

Después del nacimiento el becerro se pone en contacto con un medio rico en microorganismos y desprovisto de inmunoglobulinas que lo protejan.

La determinación de inmunoglobulinas es útil como un método para examinar la condición de los becerros adquiridos por los centros de cría, así como para diagnosticar una hipogammaglobulinemia en el becerro enfermo y para investigar un problema de morbilidad y mortalidad en la población de neonatos.

OBJETIVO

Que el alumno aprenda a realizar algunas técnicas de cuantificación de anticuerpos en un becerro neonato y con ello forme un criterio para evaluar el estado inmune de los animales y su posible permanencia a futuro dentro de la explotación.

MATERIAL

EQUIPO

- Espectrofotómetro

REACTIVOS

- Solución de sulfito de sodio en las siguientes concentraciones:

A. Solución al 14%

Sulfito de sodio anhídrido.....14g

Agua destilada, aforar a.....100 ml

B. Solución al 16%

Sulfito de sodio anhídrido.....16 g

Agua destilada, aforar a.....100 ml

C. Solución al 18%

Sulfito de sodio anhídrido.....18 g

Agua destilada, aforar a.....100 ml

BIOLÓGICO

- Un ml de suero de becerro neonato

Nota: Es indispensable para estas pruebas que la muestra sea de **SUERO** y no de **PLASMA** ya que este contiene proteínas que precipitarían con las inmunoglobulinas dando falsos resultados.

Igualmente la presencia de anticoagulantes (heparina, EDTA, etc.) causa alteraciones en los resultados. La hemólisis parcial no altera los resultados de la prueba.

- Tres tubos de ensaye de 5 a 10 ml de capacidad
- Tres pipeta de laboratorio o jeringas de 1 ml de capacidad
- Una pipeta o jeringa de 1 ml y de 5ml de capacidad
- Una gradilla

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Existen diferentes pruebas que determinan la cantidad de anticuerpos en el becerro neonato, sólo veremos algunas de ellas, que son muy sencillas, rápidas y de buena confiabilidad para la cuantificación:

- 1.- Prueba de precipitación del sulfito de sodio
- 2.- Prueba de turbidez del sulfato de zinc

1. PRUEBA DE PRECIPITACIÓN DE SULFITO DE SODIO

Esta prueba se basa en la precipitación de las inmunoglobulinas del suero por las sales de sulfito de sodio, al ponerse en contacto: se realiza con un mínimo de equipo y constituye un método rápido de alta precisión capaz de ser usado en condiciones de campo.

La prueba de sulfito de sodio es útil cuando se usa sobre animales de 24 hrs. a 3 semanas de edad, Su interpretación es de tipo objetivo y tiene un porcentaje de confiabilidad del 93% aproximadamente.

PROCEDIMIENTO



Figura 49. En cada uno de los tres tubos de ensaye se coloca 0.1 ml de suero de becerro con la jeringa o pipeta de 1 ml de capacidad.



Figura 50. Al primer tubo se le añade 1.9 ml de solución de sulfito de sodio al 14%, utilizando una de las pipetas de 5 ml de capacidad. Con el segundo y tercer tubo se hace lo mismo, añadiéndoles las soluciones al 16% y al 18% y utilizando dos pipetas diferentes.

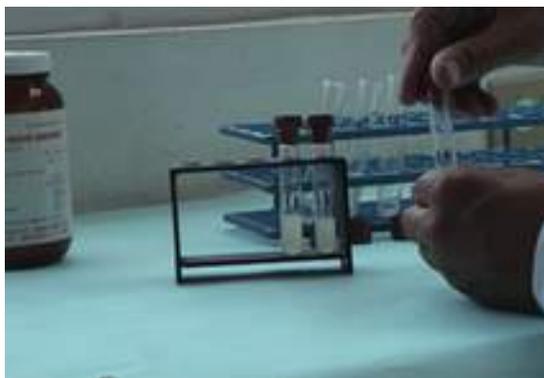


Figura 51. Se mezcla bien el contenido de los tres tubos y se dejan a temperatura ambiente por espacio de una hora.



Figura 52. Se observan los tubos y de acuerdo al número de estos en que ocurrió la precipitación, se interpretan los resultados.

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

A.- Si la precipitación no ocurre en tubo alguno u ocurre sólo en el tubo con 18% de Na_2SO_3 (Fig. 53), el becerro tendrá una concentración menor a 5 mg de inmunoglobulinas totales por ml de sangre; es decir que ha habido una falla en la transferencia pasiva de inmunoglobulinas al neonato y son insuficientes. Un buen número de los becerros mueren a consecuencia de septicemia y diarrea por falta de un adecuado título inmunoprotector.

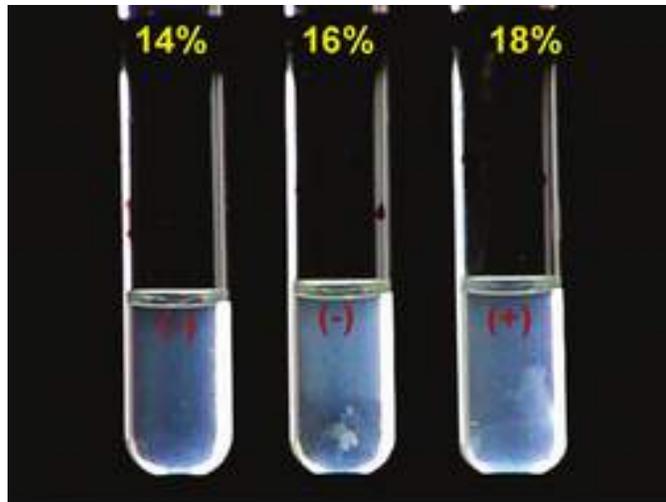


Fig. 55
Figura 53. Precipitación en el tubo con 18%.
 Prueba de precipitación de sulfito de sodio

B.- Si la precipitación ocurre en los tubos con el 16% y el 18% de Na_2SO_3 , el becerro posee entre 5 y 15 mg de inmunoglobulinas totales/ml de sangre. Estos becerros pueden mantenerse sanos si la exposición a agentes patógenos es reducida, y en el caso de enfermarse (principalmente de diarrea) pueden salvarse con tratamiento adecuado (Fig. 54)

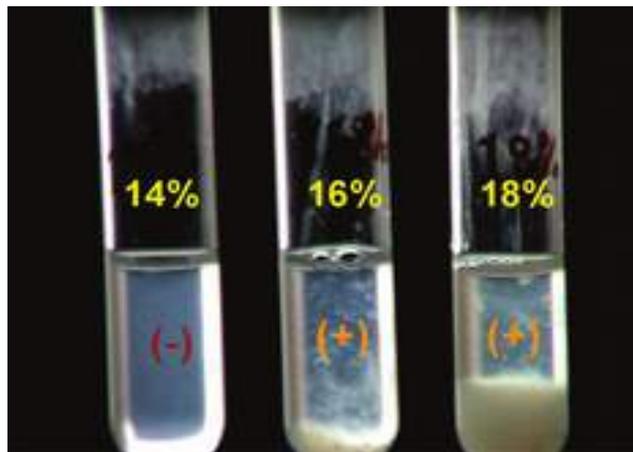


Fig. N.º 62
Figura 54. Reacción positiva en tubos 16 y 18%.
 Reacción positiva en tubos 16 y 18%

C.- Si la precipitación ocurre en los 3 tubos, 14%, 16% y 18%, entonces el nivel de inmunoglobulinas séricas totales será mayor a 15 mg/ml. Estos animales aún en el caso de desarrollar diarrea, responden favorablemente al tratamiento y son los mejores candidatos para la crianza (Fig. 55)

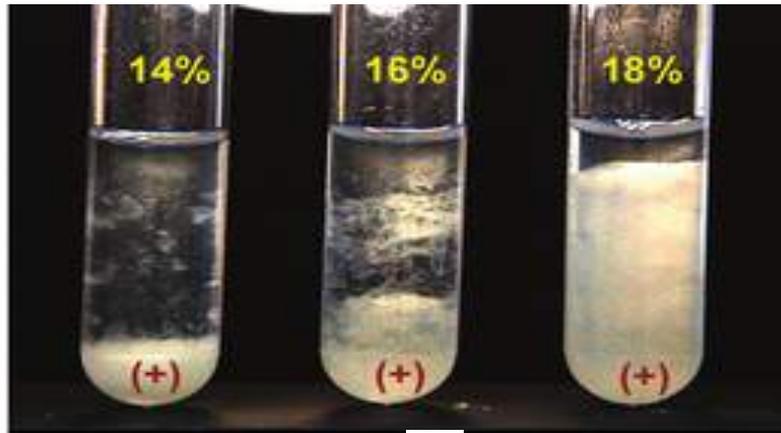


Fig. 77

Figura 55. Reacción positiva en los 3 tubos.
Reacción positiva en los 3 tubos

2. PRUEBA DE TURBIDEZ CON SULFATO DE ZINC

La prueba de turbidez del sulfato de zinc, a semejanza de la prueba de precipitación de sulfato de sodio, se basa en la precipitación de las inmunoglobulinas al entrar en contacto el sulfato de zinc con el suero.

El grado de turbidez desarrollado por la reacción tiene una correlación de 0.96% con el contenido de la IgG o IgM del suero.

Sin embargo, esta prueba puede verse afectada por la temperatura ambiente, el período de incubación, la presencia del bióxido de carbono en el reactivo y el grado de hemólisis de la muestra.

MATERIAL

REACTIVOS

104 mg de sulfato de zinc heptahidratado ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)

500 ml de agua destilada hervida por 15 min. para remover el bióxido de carbono.

BIOLÓGICO

1 ml de suero de becerro.

EQUIPO



Figura 56. Espectrofotómetro.



Figura 57. Espectrofotómetro.

DIVERSO

1 frasco de 500 ml de capacidad, color ámbar, con tapón de hule

Tubos de ensaye de 10 ml de capacidad

1 jeringa de 10 ml de capacidad con aguja del número 20

Una pipeta o jeringa de 1 ml de capacidad con graduaciones de 0.1 ml

PREPARACIÓN DEL REACTIVO

Se colocan 104 mg de sulfato de zinc heptahidratado dentro del frasco color ámbar y se añade agua destilada, (previamente hervida y a temperatura ambiente) hasta llegar a la marca de los 500 ml, se cierra con el tapón de hule inmediatamente y se agita hasta lograr una dilución total de la sal. Se fija el tapón a la botella por medio de tiras de tela adhesiva para un buen sellado.

PROCEDIMIENTO



Figura 58. Se toma 0.1 ml de suero y se coloca en un tubo de ensayo al cual se le agrega 6 ml de solución de sulfato de zinc, utilizando la jeringa de 10 ml, con aguja calibre 20. Esto es con el objeto de hacer un orificio lo más pequeño posible y evitar la entrada de bióxido de carbono al frasco.



Figura 59. Se agita suavemente la muestra y se deja incubar por una hora a temperatura ambiente de 20 °C.



Figura 60. Calibración del espectrofotómetro. Se calibra el espectrofotómetro a 0, utilizando un tubo control con el reactivo de sulfato de zinc. A continuación se mezcla bien el contenido del tubo prueba y se realiza la lectura.



Figura 61. Lectura. Se lee el grado de absorbancia (turbidez) a una longitud de onda de 660 nm en el espectrofotómetro.

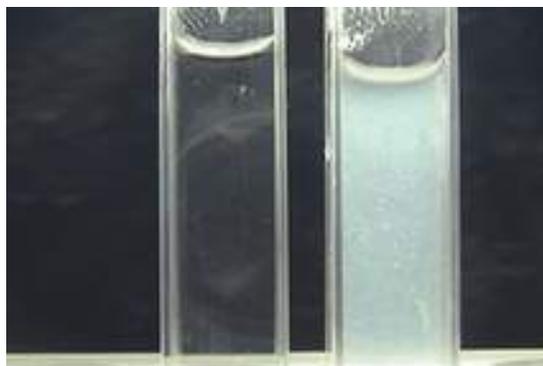


Figura 62. Resultado. El resultado se multiplica por 10 y se expresa con el número de unidades de turbidez de sulfato de zinc (UTSZ).

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

El número de UTSZ corresponde a los miligramos de inmunoglobulinas totales por mililitro de suero y se relacionan con las posibilidades de supervivencia del becerro, como se detalla a continuación.

Menos de 10 UTSZ (menos de 10 mg/ml)

Estos niveles son insuficientes para protección adecuada, ya que una alta cantidad de los animales el 60% muere a causa de septicemia (30% por *E. coli* a pesar de recibir tratamiento).

De 10 a 20 UTSZ (de 10 a 20 mg/ml)

Aproximadamente el 20% de los becerros sucumben a causa de la acción de organismos patógenos sobre mucosa intestinal (diarrea principalmente).

Más de 20 UTSZ (más de 20 mg/ml)

Este es el nivel mínimo necesario para lograr una lactación exitosa en el neonato. Sólo un reducido porcentaje de estos becerros el 7% mueren a consecuencia de diarreas y deshidratación.

A medida que aumentan los niveles de anticuerpos, la mortalidad por causas infecciosas se reduce hasta eliminarse por completo cuando los animales sobrepasan las 40 UTSZ.

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

El contenido de los tubos con suero y los reactivos adicionados como el Sulfito de Sodio al 14%, 16% y 18% y el Sulfato de zinc serán depositados en un contenedor destinado al almacenamiento de estos hasta su canalización a la empresa contratada por la Universidad para este fin.

Las puntas de la micropipeta, las pipetas y los tubos vacíos se colocarán en un recipiente conteniendo cloro al 1% para la inactivación de los mismos y su posterior esterilización y posible reciclado.

Las jeringas serán canalizadas al contenedor destinado para su almacenamiento y posterior eliminación según la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002

RESULTADOS

Título de suero No. 1.-

Título del suero No. 2.-

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1. ¿Qué beneficio se obtiene en la explotación bovina si establecemos rutinariamente la realización de pruebas que cuantifican los niveles de anticuerpos que poseen los animales recién nacidos?

2. ¿Cuáles son las principales enfermedades que puede presentar un becerro neonato si tuvo una pobre ingesta de calostro al nacimiento?

3. ¿Cómo reportamos (indicando título y nivel de protección) a un animal en el que se detectó que su suero formó grumos en los tubos con el 16% y 18% en la prueba de Sulfito de sodio?

4. ¿Cuántas UTSZ deberá presentar el suero de un becerro debidamente inmunoprotegido?

5. ¿Se puede utilizar para la determinación de anticuerpos por la prueba de Sulfato de Zinc un suero con una breve hemólisis?

BIBLIOGRAFÍA

Morilla GA, Bautista GC, Manual de Inmunología. México DF. Ed. Diana. 237-247. 1986.

Quiroz Rocha GF, Bouda J, Nuñez Ochoa L, Yabulta Osorio AK. Impacto de la administración y la calidad del calostro sobre los niveles de inmunoglobulinas séricas en becerros. Vet. Mex. 29(2) 1998.

http://www.produccion-animal.com.ar/informacion_tecnica/cria_amamantamiento/01-calostro.htm

<http://www.cuencarural.com/ganaderia/bovinos/67151-profilaxis-de-la-salmonelosis-de-los-terneros-por-inmunizacion-materna/>

Seminario Nacional de Actualización en Sanidad y Producción Bovina UDCA - UN - ICA - Secretaría de Agricultura y Desarrollo Económico de Cundinamarca 2005

NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

PRÁCTICA 5

AGLUTINACIÓN

INTRODUCCIÓN

La aglutinación es el resultado de la unión antígeno-anticuerpo en la cual el antígeno es particulado e insoluble como bacterias y eritrocitos. Los anticuerpos se combinan con rapidez con las partículas antigénicas (interacción primaria) traduciendo en la formación de grumos o aglutinados que se pueden observar a simple vista (interacción secundaria).

Los anticuerpos del isotipo IgM son considerablemente más eficientes que los IgG en estas pruebas de diagnóstico, sin embargo, en los procedimientos convencionales no es posible diferenciarlos recurriéndose a pruebas más específicas para ello, como la prueba de rivanol utilizada para el diagnóstico de la Brucelosis bovina.

Los anticuerpos generalmente se obtienen del suero, pero también se pueden obtener de las siguientes fuentes

- a) Leche entera (no pasteurizada)
- b) Sangre completa
- c) Yema de huevo
- d) Exudado vaginal

La aglutinación es una técnica tanto cualitativa como cuantitativa. La podemos dividir en dos tipos:

- a) Aglutinación directa
- b) Aglutinación indirecta

OBJETIVO

Que el alumno realice la técnica de aglutinación directa para el diagnóstico de enfermedades infecciosas de interés veterinario.

AGLUTINACIÓN DIRECTA

La aglutinación directa es una técnica de diagnóstico utilizada para el reconocimiento de enfermedades infecciosas de origen bacteriano, como la Brucelosis, Salmonelosis Aviar, Micoplasmosis Porcina y Pleuroneumonía Contagiosa Porcina.

DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS

El método oficial para el diagnóstico serológico de la brucelosis bovina, está basado en pruebas de aglutinación directa, debido a que estas técnicas presentan una alta especificidad y sensibilidad, unidas a su bajo costo y rápida realización.

Para el diagnóstico de la brucelosis se han desarrollado una serie de técnicas que están incluidas en la norma oficial NOM-041-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

PRUEBAS DE AGLUTINACIÓN AUTORIZADAS EN LA CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA BRUCELOSIS

- a) Prueba de Bang o de anillo en leche
- b) Prueba en tarjeta
- c) Prueba de rivanol

a) PRUEBA DE BANG O DE ANILLO EN LECHE

La prueba de anillo en leche, es una prueba de sondeo que se realiza a nivel de hato, se usa para el diagnóstico en zonas libres, sospechosas e infectadas.

Esta prueba se realiza en muestras obtenidas de botes colectores o enfriadores de leche (esta técnica y con los reactivos empleados no es útil para leche de cabras o borregas).

MATERIAL

BIOLÓGICO



Figura 63. Antígeno para la prueba de anillo en leche.

- Cepa Brucella abortus 1119-3 a una concentración de 4.5% teñido con hematoxilina.
- Leche: debe refrigerarse entre 2 a 5 °C al menos por 12 horas con un máximo de 72 horas antes de realizar la prueba.

EQUIPO

- Estufa bacteriológica o baño maría a 37 °C

DIVERSO

- Tubo de ensaye con tapón de hule o baquelita de 13 X 100 mm
- Gradilla
- Pipeta serológica de 5 ml de capacidad
- Gotero para 0.03 ml

MATERIAL SOLICITADO AL ALUMNO

-Guantes de látex para cirugía no estériles

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

1. La leche y el antígeno deberán permanecer de 30 a 60 min a temperatura ambiente (20-25 °C) antes de efectuar la prueba. Colocar el tubo en la gradilla e identificarlo con el número de la muestra problema.



Figura 64. Depositar en el tubo 1 ml de la leche problema, utilizando la pipeta de 5 ml.

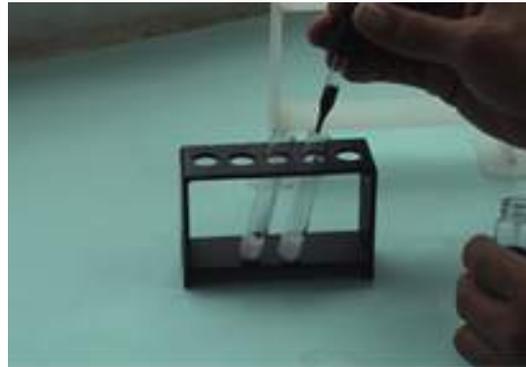


Figura 65. Agregar con el gotero, una gota de antígeno en el tubo.



Figura 66. Mezclar la leche y el antígeno mediante la inversión del tubo por tres ocasiones, haciéndolo suavemente.



Figura 67. Incubar en estufa bacteriológica a 37 °C durante 30-60 min, o en baño maría.

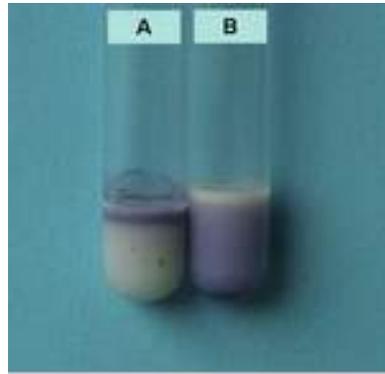


Figura 68. Realizar la lectura de la prueba.

LECTURA DE LA PRUEBA DE ANILLO EN LECHE

Resultado positivo: El antígeno aglutinado se observa en la superficie formando un anillo azul y la columna restante blanca.

Resultado negativo: No se observa cambio, el tubo con leche se observa uniformemente coloreado (azul).

En el caso de los caprinos, el anillo se observa tanto en la parte inferior como en la parte superior del tubo, razón por la que no se utiliza esta prueba, en esta especie.

Principales factores que influyen en los resultados obtenidos de la prueba de anillo en leche:

- El porcentaje de grasa que contiene la muestra.
- La excesiva agitación de la muestra.
- Tiempo y temperatura de almacenaje. Las muestras de leche pueden conservarse en perfecto estado si se almacenan a 4° C durante 72 horas, temperaturas más altas y tiempos más prolongados pueden causar pérdida de anticuerpos.
- Modificar las cantidades marcadas por la técnica.

Reacciones falsas positivas

- 1.- Leche recientemente ordeñada
- 2.- Leche de vacas con mastitis.
- 3.- La presencia de calostro o sangre
- 4.- Leche de vacas en lactación no infectadas, que hayan sido vacunadas dentro de los tres meses anteriores al muestreo con la vacuna Cepa B19.

b) PRUEBA DE TARJETA

La prueba de tarjeta es también llamada Card-test o Rosa de Bengala. Debido a las condiciones ácidas del antígeno, esta prueba detecta únicamente IgG específica para *Brucella sp.*, ya que las IgM son desnaturalizadas.

Es una prueba tamiz de tipo cualitativo simple y rápida, debido a que puede realizarse sin requerir equipo especializado y no es necesaria mucha experiencia para su interpretación; es útil en el reconocimiento de la infección temprana y puede usarse como prueba inicial de selección, ya que detecta más rápido los sueros positivos a la infección; Es un método excelente para trabajar sueros a gran escala.

Es importante mencionar que este método de prueba está indicado en el diagnóstico de la brucelosis caprina utilizando el antígeno comercial al 3% (PRONABIVE).

En animales con infección natural, la prueba de tarjeta normalmente es positiva, seguida por la prueba de rivanol. Las reacciones positivas falsas se estiman entre el 1 y 3 %, dependiendo del nivel de infección y de los antecedentes del rebaño. Las reacciones falsas negativas se estima que oscilan entre 1 - 2%, por lo que la prueba es confiable.

MATERIAL

BIOLÓGICO

- Antígeno de tarjeta. Es un antígeno brucelar amortiguado estable, que consiste en una suspensión de *Brucella abortus* cepa 1119-3 con una concentración 8% en un amortiguador de lactato, a un pH de 3.5 +/- 0.05 y teñida con rosa de Bengala.
- Suero problema



Fig No. 1 Antígeno de tarjeta
Figura 69. Antígeno de tarjeta y suero problema.

EQUIPO

- Un aglutinoscopio (utilizando luz indirecta al realizar la lectura)
- Placa de cristal con cuadrícula de 3 x 3 cm



Figura 70. Aglutinoscopio y placa de cristal.

DIVERSO

- 2 goteros o jeringas insulínicas

-Palillos de madera

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



Figura 71. Sacar el suero problema, suero control y el antígeno del refrigerador y dejar a temperatura ambiente durante 30 a 60 minutos antes de realizar la prueba.



Figura 72. Se depositan 0.03 ml de suero sobre la placa o tarjeta en cada cuadro.



Figura 73. Agregar el reactivo a un lado del suero y mezclar con un palillo.



Figura 74. Se depositan 0.03 ml de antígeno sobre la placa o tarjeta. Se mezclan con un palillo en forma circular.



Figura 75. Después de mezclados, se imprime a la placa un ligero movimiento de vaivén, o bien utilizando un aparato mezclador, durante 4 min (cuidando que no se mezclen entre sí las pruebas).

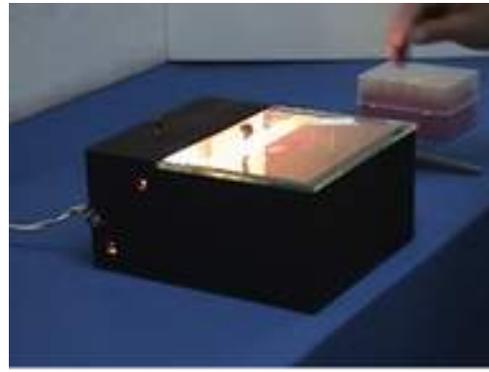


Figura 76. Pasados los 4 min, proceder de inmediato a efectuar la lectura.



Figura 77. Observación de la aglutinación.

INTERPRETACIÓN

Resultado negativo: Se aprecia un color rosado uniforme sin aglutinación ni formación de grumos.

Resultado positivo: Se consideran positivos todos aquellos sueros que presentan aglutinación, desde grumos apenas perceptibles hasta la formación de grumos muy evidentes. Los grumos se aprecian teñidos y el líquido se observa semitransparente.

Los sueros con resultados positivos deberán pasar a una segunda prueba confirmatoria. En el caso de los bovinos, la prueba confirmatoria es la de rivanol o la fijación de complemento. Esto es lo que marca la campaña contra la brucelosis bovina.

c) PRUEBA DE RIVANOL

Esta prueba fue desarrollada por Anderson (1964), basada en que el rivanol, que es un colorante de acridina, tiene la capacidad de precipitar las proteínas del suero bovino. Mediante el uso de cantidades iguales de suero y una solución al 1% de rivanol, se forma un precipitado (que contiene la IgM) y el sobrenadante que contiene exclusivamente las IgG.

MATERIAL

BIOLÓGICO

- Antígeno de *Brucella abortus* especial para la prueba de Rivanol, que contiene 4% de células por volumen con un pH de 5.8 a 6.2
- Suero problema, Sueros controles (+ y -)



Figura 78. Reactivo.

REACTIVOS

- Una solución al 1% de rivanol (lactato 2-etoxi-6,9 diaminoacridina). Se debe almacenar en refrigeración a 4-6° C

EQUIPO

- Un aglutinoscopio (utilizando luz indirecta al realizar la lectura)
- Centrífuga

- Balanza granataria de dos platos
- Una placa de cristal

DIVERSO

- 1 Pipeta serológica (1.0 ml graduadas en centésimas)
- 1 Pipeta serológica (1.0 ml graduada en décimas)
- 2 jeringas o goteros
- Tubos de ensaye de 13 X 100 mm
- Una gradilla
- Palillos de madera

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



Figura 79. Con una pipeta colocar 0.4 ml de la solución de suero en cada tubo.



Figura 80. Con una pipeta colocar 0.4 ml de rivanol en cada tubo.



Figura 81. Mezclar inmediatamente agitando el tubo.



Figura 82. Se incuban a temperatura ambiente durante 20 a 30 min.



Figura 83. Centrifugar a 2000 RPM durante 5 min.



Figura 84. Con una pipeta serológica (centesimal) se toma el sobrenadante y se coloca en los cuadros de la placa de vidrio las cantidades de 0.08; 0.04; 0.02 y 0.01 ml.

Se agrega una gota de 0.03 ml del antígeno a cada dilución y se mezcla con el palillo de madera a partir de 0.01 hasta 0.08 ml.



Figura 85. Se incuba durante 12 min a temperatura ambiente.



Figura 86. Al cabo de los primeros 6 min. se mueve la placa en forma rotatoria. Transcurridos los 12 min se mueve nuevamente la placa y se realiza la lectura.

LECTURA DE LA PRUEBA

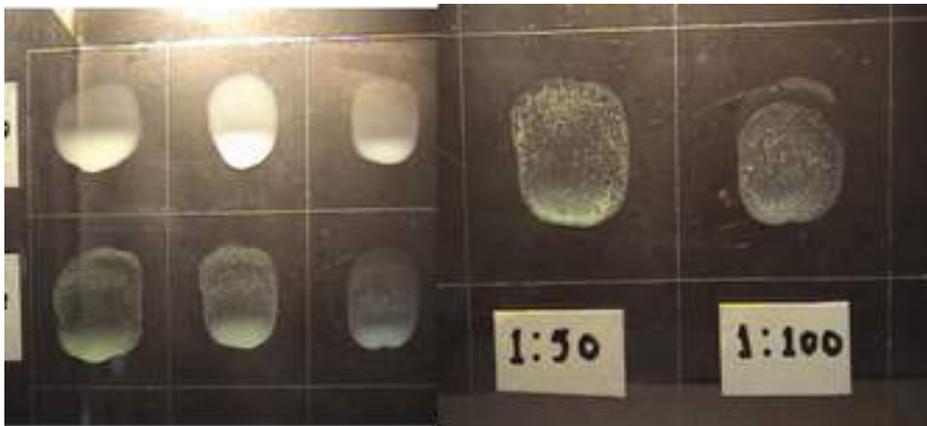


Figura 87. Resultados.

La prueba se considera positiva cuando hay aglutinación de cualquier grado

El resultado se expresa como la dilución más alta en la que se observa aglutinación.

Las diluciones corresponden con los títulos como sigue:

Cuadro 14

Volumen de la gota	Dilución
0.080	1:25
0.040	1:50
0.020	1:100
0.010	1:200

Negativos no hay evidencia de aglutinación.

INTERPRETACIÓN

En animales vacunados: la aglutinación completa en una dilución mayor o igual a 1:50 será positiva.

En animales no vacunados: cualquier aglutinación se considera positiva.

Nota: La presencia de hemólisis en las muestras de suero interfiere en el resultado de la prueba.

Cuadro 15

COMPARACIÓN DE LAS PRUEBAS PARA EL DIAGNÓSTICO
DE BRUCELOSIS DE LOS BOVINOS

Prueba	Anticuerpo que detecta	Comentario
Fijación del complemento	IgM, IgG2, IgG1	Prueba sensible, pero laboriosa
ELISA	Todos	Altamente sensible
Tarjeta	IgG1, IgG2	Disminuye los resultados falsos positivos.

Anillo en leche	IgA, IgG, IgM	Prueba poblacional (hato)
Rivanol	IgG	Es más sensible y específica que la de Tarjeta

DIAGNÓSTICO DE SALMONELOSIS EN AVES

En las aves se presentan dos cuadros clínicos producidos por el género *Salmonella la tifoidea aviar* causada por *S. gallinarum* y la Pulorosis provocada por *S. pullorum*, ambas son de gran importancia económica y zoonótica.

La respuesta inmune del ave infectada, produce anticuerpos de la clase IgM y de la clase IgG en un periodo de 7 a 14 días. Estos anticuerpos pueden persistir por largos periodos en el organismo de las aves.

Los procedimientos de diagnóstico se encuentran establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993 CAMPAÑA NACIONAL CONTRA LA SALMONELOSIS AVIAR

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA SALMONELOSIS

- 1.- Aglutinación rápida en placa con sangre completa
- 2.- Aglutinación en tubo con suero
- 3.- Prueba de ELISA (detecta el LPS o antígeno O)

Nota: En esta sesión práctica solamente se realizara la prueba de aglutinación rápida en placa con sangre completa.

AGLUTINACIÓN RÁPIDA EN PLACA CON SANGRE COMPLETA

La prueba se realiza en una placa de vidrio, utilizando un antígeno teñido con cristal violeta, por lo cual la aglutinación de los microorganismos se observa con rapidez cuando el ave tiene anticuerpos contra el microorganismo. En esta prueba son particularmente eficientes las IgM por lo que la prueba es positiva desde las primeras etapas del desarrollo de anticuerpos. Es un método rápido de aglu-

tinación en una placa que sirve para detectar anticuerpos contra *S. pullorum* y *S. gallinarum*. Esta técnica es aplicada como prueba de campo en los programas de vigilancia epidemiológica, y en el laboratorio como método complementario a la identificación bacteriológica.

MATERIAL

BIOLÓGICO

- Antígeno K polivalente de *Salmonella pullorum*
- Sangre o suero de ave

EQUIPO

- 1.- Aglutinoscopio metálico o de madera con fuente de luz indirecta

DIVERSO

- 1.- Palillos de madera
- 2.- Placa de vidrio para la prueba de aglutinación o portaobjetos

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- 1.- Colocar una gota de sangre en la placa de vidrio
- 2.- Adicionar una gota de 0.03 ml del antígeno K polivalente
- 3.- Mezclar la sangre con el antígeno teñido con un palillo de madera y mover la placa con tres o cuatro movimientos rotatorios en forma manual

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Reacción positiva: Se considera positivo si la aglutinación ocurre entre cero y 90 segundos después de mezclar la muestra de sangre o del suero con el antígeno.

Reacción sospechosa: Si la aglutinación ocurre entre 90 y 120 segundos después de mezclar la muestra.

Reacción negativa: Cuando la aglutinación ocurre después de 120 segundos posteriores a la mezcla o no se observa.

CUADROS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

Se deberá anotar los resultados obtenidos y la interpretación de cada prueba realizada:

Cuadro 16

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA BRUCELOSIS

	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
1. Prueba en tarjeta		
2. Prueba de rivanol		

Cuadro 17

DIAGNÓSTICO SEROLÓGICO DE LA SALMONELOSIS

	RESULTADO	INTERPRETACIÓN
1. Aglutinación rápida en placa con sangre completa		

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Por grupo se entregará un frasco con desinfectante (cloro al 1%) en el cuál se deberán colocar los palillos y puntas utilizadas.

El material de cristalería, tales como tubos y placa de cristal se colocará en un recipiente con cloro al 1%

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1.- ¿Cuál es la importancia clínica y de salud pública de la Brucelosis en bovinos?

2.- Menciona tres signos clínicos característicos de importancia de la Tifoidea aviar y Pulorosis:

3.- Menciona tres signos clínicos característicos de importancia de la Brucelosis Bovina:

4.- Menciona las vacunas empleadas por la campaña nacional para la prevención de Brucelosis en bovinos:

5.- Menciona cual es la diferencia entre una cepa lisa y una rugosa:

BIBLIOGRAFÍA

Norma Oficial Mexicana NOM-005-ZOO-1993, Campaña Nacional contra la Salmonelosis Aviar.

Tyhose et pullorose aviaires. Shivaprasad H.L. Rev.sci.tech.Off.int.Epiz. 2000, 19(2), 405-42

Revisión sobre pullorosis y tifosis aviar; nuevos enfoques para viejos conceptos. <http://www.inta.gov.ar/balcarce/info/documentos/ganaderia/otras/aves/pullorosis.htm>

SENASICA Servicio Nacional de Sanidad, Inocuidad y Calidad Agroalimentaria-
<http://web2.senasica.sagarpa.gob.mx/xportal/dgsa/czoo/Doc467/>

NORMA Oficial Mexicana NOM-056-ZOO-1995, Especificaciones técnicas para las pruebas diagnósticas que realicen los laboratorios de pruebas aprobados en materia zoosanitaria. www.economia.gob.mx/work/normas/noms/1999/056zoo.pdf

NORMA Oficial Mexicana NOM-041-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Brucelosis en los Animales.

PRÁCTICA 6

DETERMINACIÓN DEL GRUPO SANGUÍNEO

INTRODUCCIÓN

La superficie de los eritrocitos humanos contiene un conjunto de moléculas antigénicas determinados genéticamente, por lo que se dividen en diferentes grupos sanguíneos.

Estos antígenos son fundamentalmente glicoproteínas integrales de la membrana plasmática del eritrocito.

El grupo sanguíneo se hereda, al igual que el color de los ojos, se transmite genéticamente de padres a hijos.

El principal sistema de grupos sanguíneos es el "Sistema ABO" se basa en el tipo de glucoproteínas presentes sobre la superficie del eritrocito. Las personas de tipo "A" tienen glucoproteínas de tipo "A" sobre la superficie de sus eritrocitos; las de tipo B, glucoproteínas de tipo "B"; las de tipo "AB", presentan ambos tipos de glucoproteínas; y las del grupo "O" carecen de ambas. Estas glucoproteínas son reconocidas por anticuerpos específicos, habitualmente de la clase IgM.

En sangre pueden existir anticuerpos anti-A y anti-B, que se combinan con los antígenos A y B, respectivamente. Como consecuencia de esta unión los eritrocitos forman grumos, lo que ocasiona una hemólisis intravascular.

Esta es la razón por la que se determina el grupo sanguíneo antes de transfundir sangre de una persona a otra. El donante y el receptor han de ser compatibles, de lo contrario puede provocar la lisis de los glóbulos rojos extraños a través de los anticuerpos y del complemento (reacción transfusional). Las IgM frente a estos antígenos existen ya previamente en un huésped nativo antes de la transfusión, y se ha especulado que surgen como respuesta a Ag microbianos que tienen actividad cruzada entre ellos.

En el área de Medicina Veterinaria sólo es de importancia práctica el conocer el grupo sanguíneo en perros, gatos y equinos aunque hoy en día también se puede saber el grupo sanguíneo de bovinos, cerdos, ovinos etc.

FUNDAMENTO

Esta técnica se basa en la propiedad aglutinante que tienen los antígenos ABO y RhD de la superficie de los eritrocitos humanos para reaccionar con los anticuerpos anti-A o anti-B y anti RhD.

Cuadro 18

ANTÍGENOS Y ANTICUERPOS EN LOS GRUPOS SANGUÍNEOS "ABO" HUMANOS

Grupo sanguíneo	Ag. presente en eritrocito	Ac. En plasma	Puede recibir sangre de:	Puede donar sangre a:
A	A	Anti-B	A y O	A y AB
B	B	Anti-A	B y O	B y AB
AB	A y B	Ninguno	AB, A, B, O	AB
O	Ninguno	Anti-A y Anti-B	O	O, A, B, AB

El segundo sistema importante de grupos sanguíneos humanos es el "Sistema Rh", (Rh el cual proviene del *Macacus rhesus rhesus*, el género de monos en que fue identificado por primera vez). La clasificación Rh se basa en la presencia o ausencia del antígeno Rh también denominado "D" (RhD) en los eritrocitos. Las personas RhD (+) poseen el antígeno RhD, mientras que las personas RhD (-) carecen de él.

OBJETIVO

Que el alumno entienda como se tipifica el grupo sanguíneo de un individuo, la forma de realizar la técnica y que cada alumno determine a qué grupo pertenece.

MATERIALES Y REACTIVOS

BIOLÓGICOS

- Solución anti -A
- Solución anti -B
- Solución anti-D (anti Rh)
- Placa y lanceta



Figura 88. Material requerido.

DIVERSO

- Tarjetas de identificación sangre (gota) o placa de aglutinación.
- Lanceta estéril
- Palillos
- Algodón
- Agua oxigenada o alcohol

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL



Figura 89. Asepsia de dedo.



Figura 90. Punción.

Llevar acabo la asepsia de la zona a puncionar, utilizando algún antiséptico (fig. 89)

Pinchar la yema del dedo previa desinfección y depositar una gota de sangre en cada casilla (deben ser tres muestras fig. 91)



Figura 91. Depositar la gota de sangre.



Figura 92. Agregar antisuero A en el primer pozo.



Figura 93. Agregar antisuero B al segundo pozo.



Figura 94. Agregar en el tercer pozo antisuero Rh



Figura 95. Mezclar cada pozo.

Una vez agregado la gota de sangre y los antisueros, se procede a mezclarlos perfectamente cada uno con su respectivo palillo en forma circular.

RESULTADOS

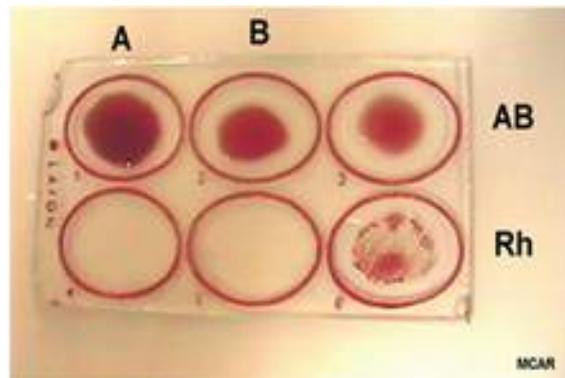


Figura 96. Observar la presencia de grumos que indica el grupo sanguíneo.

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Por grupo se entregará un frasco con desinfectante (cloro al 1%) en el cuál se deberán colocar los palillos utilizados, así como también una bolsa color amarillo para los algodones utilizados antes y después de la punción del dedo.

Por grupo se pondrá el recipiente para punzocortantes color rojo, para que los alumnos depositen ahí las lancetas, posteriormente el material antes mencionado será llevado a incinerar.

RESULTADOS

Anota tus resultados y los de tu equipo, que observaste durante la práctica.

Cuadro 19

No.	Anti-A	Anti-B	Anti-AB	Rh
1				
2				
3				
4				
5				

Nota: Cualquier tipo de aglutinación se considera POSITIVA. La ausencia de aglutinación al cabo de 1 minuto se considera NEGATIVA

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1. ¿Qué es aglutinación?
2. ¿Por qué son importantes las normas en inmunología?
3. ¿Cómo se obtiene un antisuero?

4. ¿Qué es un inmuno-complejo?

5. ¿Cuál es el fundamento inmunológico de las transfusiones sanguíneas?

BIBLIOGRAFÍA

Tizard IR, editor. Veterinary immunology. An Introduction. 10th ed. USA: SAUNDERS, 2009.

Abbas, Abdulk y co. Inmunología celular y molecular. 6^a ed. USA: SAUNDERS COMPANY, 2008

PRÁCTICA 7

PRECIPITACIÓN

INTRODUCCIÓN

La reacción de precipitación en tubo se hace patente si una cantidad adecuada de antígeno soluble se mezcla con un antisuero y se incuba a 37°C, la mezcla se torna turbia en unos pocos minutos, después se presentan flóculos, y por último se produce un precipitado en el fondo del tubo (complejos antígeno-anticuerpo).

Si se mezclan cantidades de un antígeno soluble con una cantidad constante de anticuerpo, la cantidad de precipitado que se produce es determinada por las proporciones relativas de los reactivos. A concentraciones bajas de antígeno no se forma ningún precipitado evidente, a medida que aumenta la cantidad de antígeno se produce cantidades mayores de precipitado, hasta que este alcanza su máximo punto. Cuando se agrega aún más antígeno, la cantidad de precipitado disminuye en forma gradual hasta que no se observa nada de éste en tubos, tienen un gran exceso del antígeno. Figs. 97 y 98.

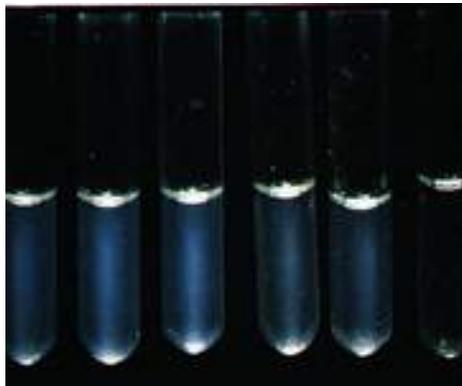


Figura 97

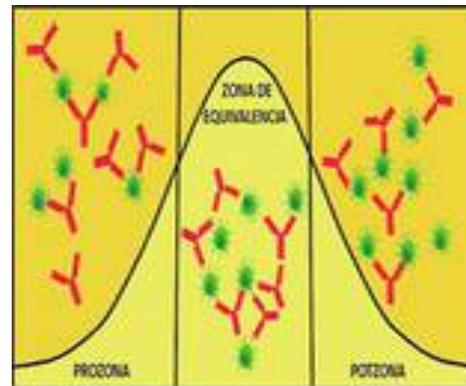


Figura 98

El descubrimiento de esta reacción o prueba se atribuye a Krause (1897). Esta prueba la usó para obtener información cualitativa acerca de antígenos y antisue-

ros. Tuvo que pasar una década más antes de ser reconocida a la precipitación como un proceso químico de diagnóstico llevado a cabo por Arrhenius, y otras dos décadas tuvieron que pasar para que la reacción química fuera utilizada por Herdberg y Kendall en el desarrollo de una reacción cuantitativa.

Últimamente se ha demostrado en el proceso, que la reacción de precipitación puede ser usada cualitativamente y cuantitativamente.

El proceso cualitativo se basa en la observación de la formación de un precipitado utilizando una placa de agar (precipitación).

El lugar en donde el anticuerpo y el antígeno se encuentran después de la difusión se denomina "Punto de Equivalencia" y se observa la formación de una línea de precipitación insoluble en la matriz de gel (Fig. 99).



Figura 99

OBJETIVO

Que el alumno entienda el principio de la reacción de precipitación de antígenos por anticuerpos y lo aplique en forma práctica en la identificación de proteínas de especies animales adulterantes en los productos cárnicos.

PRUEBA DE PRECIPITACIÓN EN GEL PARA LA IDENTIFICACIÓN DE ESPECIE EN PRODUCTOS CÁRNICOS DE ORIGEN ANIMAL

FUNDAMENTO

Esta técnica está basada en el principio de que el antígeno y el anticuerpo se difunden a través de un medio semisólido y forman complejos inmunitarios estables, que aparecen como líneas o bandas de precipitación en el sitio donde alcanzan las proporciones óptimas de ambos reactivos. La reacción se lleva a cabo en una cámara húmeda. Las líneas de precipitación son analizadas y visualizadas con luz directa.

Los procedimientos del diagnóstico se encuentran establecidos en la Norma Oficial Mexicana NOM-023-ZOO-1995, Identificación de especie animal en músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, por la prueba de inmunodifusión en gel.

MATERIAL Y MÉTODO

REACTIVOS

Cloruro de sodio (NaCl) G.R.

Fosfato monobásico de potasio G.R.

Hidróxido de sodio (NaOH) G.R.

Solución de cloruro de benzalconio al 0.13% o cloro

Agua destilada

Solución salina fisiológica

Hidróxido de sodio (NaOH) 1N

Cloruro de sodio (NaCl) al .85%

P.B.S. (pH final= 7.2)

MEDIO DE CULTIVO

Agar noble o Ion Agar No.2 (Difco): sol al 1% y sol al 2%

BIOLÓGICOS

Antisueros elaborados contra diversas especies animales (anticuerpos contra bovino, ovino, ave, equino, cerdo o canino).

Antígenos de control para la prueba o extracto de especie animal conocido.

EQUIPO

Balanza granataria

Platina caliente o Mechero Bunsen

Matraz Erlenmeyer

PREPARACIÓN DE LA MUESTRA

Los extractos de tejidos provenientes tanto de una especie animal conocida como de una desconocida, son usados como antígenos, se deben preparar por separado de la siguiente manera:

1. Tomar una muestra a partir de tejido magro o con el menor contenido de grasa y picar finamente.
2. Pesar 10 g de la muestra en un vaso de precipitado de 100 ml, adicionar 30 ml de solución salina y mezclar.
3. Agitar el contenido durante 15 minutos y dejar reposar una hora.
4. Filtrar a través de filtro Whatman No. 40 ó 42.
5. Colectar el líquido filtrado en un tubo de ensayo con tapón de rosca y usarlo inmediatamente.



Figura 100. El agar se disuelve por calentamiento hasta su clarificación (100°C).



Figura 101. En cada caja de Petri se vacían 5 ml de agar noble o Ion agar al 2%, que será la capa adhesiva o base de la caja (aproximadamente 3 mm de espesor). Se deja gelificar a temperatura ambiente.



Figura 102. Adición de la segunda capa.



Figura 103. Dejar enfriar medio.

6. La caja queda semicubierta con la tapa y cuando ya no evapora el medio, se tapa bien y se refrigera a 4°C. fig. 103



Figura 104. Perforación del medio.



Figura 105. Extracción del medio excedente.

7. Se realizan de 5 a 7 pozos periféricos de 5 mm de diámetro distanciados 1cm uno de otro y un pozo central fig. 104 y 105.

INOCULACIÓN DE LAS PLACAS

La inoculación de las placas, debe efectuarse de la siguiente manera:



Figura 106. Perforación de la placa.

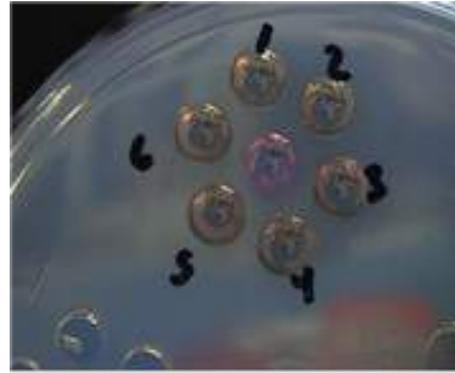


Figura 107. Identificación.

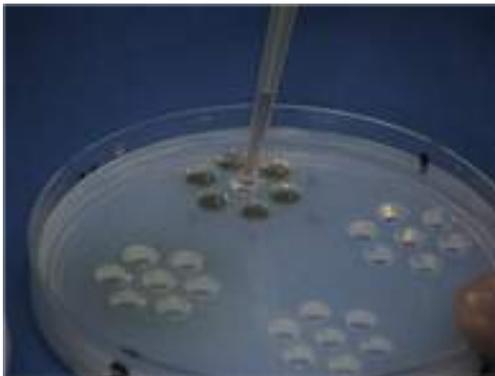


Figura 108. Colocación de los sueros.

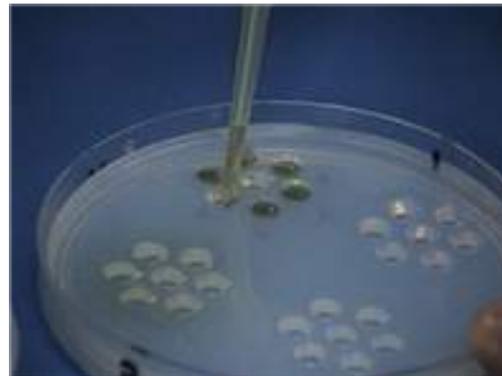


Figura 109. En los pozos periféricos depositar los antígenos obtenidos de la carne de diferentes especies animales.

Colocar en el pozo central el antisuero específico para una determinada especie animal, sin derramar o mezclar los reactantes



Figura 110. Completar el llenado de los pocillos y colocar la placa en incubación a temperatura ambiente en cámara húmeda hasta su lectura a las 24 y 48 h posteriores.

CONSIDERACIONES DE LA PRUEBA

Leer las placas sobre un fondo oscuro. Las bandas aparecerán de color blanco. Si no se han desarrollado completamente, llenar nuevamente los pozos y continuar la incubación a temperatura de refrigeración de 18-24 horas.

Cuando un suero resulta sospechoso, se diluye 1:2 en solución salina y se vuelve a probar.

En ocasiones hay una pequeña variación en las cajas debido a la deshidratación. Cuando esto ocurre, la prueba se corre por duplicado.

INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

En la interpretación de resultados, se debe determinar la especie animal a la que corresponde la muestra.

Reacción positiva: Si la continuidad entre estas líneas es absoluta, se considera que los antígenos son idénticos; Por lo que se observa una línea de precipitación entre el antisuero control positivo y el antígeno (línea de identidad total) Fig. 111

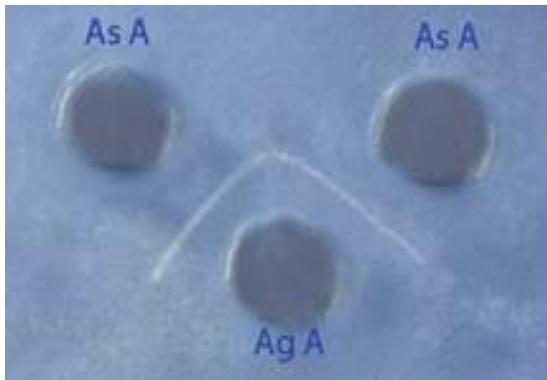


Figura 111. Identidad total.

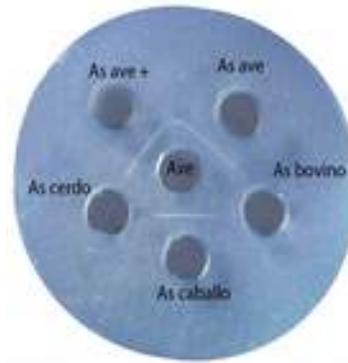


Figura 112. En el pozo central se puso como antígeno extracto proteico de carne de ave, en los pozos periféricos antisueros de ave, bovino, caballo, cerdo, notándose una línea de identidad total en carne de ave, pero también dio una línea de precipitación en carne de caballo dando como resultado una adulteración.

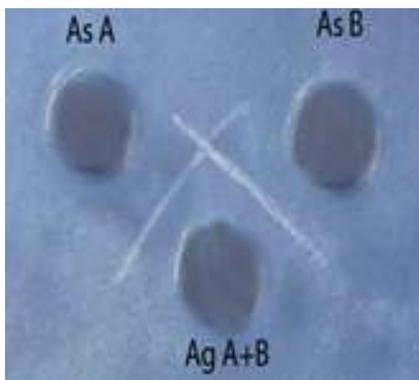


Figura 113. En el pozo central se puso un extracto de carne de ave y de bovino, en los pozos periféricos un antisuero contra ave y contra bovino, se observan 2 líneas que se cruzan, a estas líneas se les conocen como líneas de no identidad.

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

Eliminación de residuos basado en la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental residuos biológico-infeccioso.

Residuos biológicos

La caja de gel se colorará en un recipiente proporcionado por el profesor, el cual posteriormente se inactivarán en autoclave a 121°C; 15 Lbs; 30 mins.

Residuos NO biológicos

- Las puntas empleadas serán introducidas en un contenedor con desinfectante, (solución clorada al 1%).

- Guantes de látex, estos se depositarán en bolsa amarilla como indica la NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002, Protección ambiental-Salud ambiental residuos biológico-infeccioso.

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1. Menciona los métodos que existen para realizar pruebas de precipitación.
2. Menciona tres enfermedades virales, en medicina veterinaria, que se diagnostican en forma rutinaria por medio de la técnica precipitación.
3. Menciona dos aplicaciones en medicina veterinaria para la técnica de precipitación radial doble.
4. Describe el fundamento de la técnica de inmunoelectroforésis y dos aplicaciones clínicas.
5. Describe el fundamento de la técnica de inmunodifusión radial de Mancini y dos aplicaciones clínicas o diagnósticas.

BIBLIOGRAFÍA

Norma Oficial Mexicana NOM-023-ZOO-1995, Identificación de especie animal en músculo de bovinos, ovinos, equinos, porcinos y aves, por la prueba de inmunodifusión en gel.

Coggins, L.; Norcross, N.L. Immudiffusion reaction in equine infectious anemia. *Cornel Vet.* 60, 330, 1970.

Montaño Hirose Juan Antonio. Temas Selectos de Inmunología Veterinaria. Ed Manual Moderno 2005

Tizard IR, editor. *Veterinary immunology. An Introduction.* 10th ed. USA: SAUNDERS, 2009.

USDA. La Anemia Infecciosa Equina. United States Department of Agriculture Animal and Plant Health Inspection Service.
Disponible en <http://www.aphis.usda,2002>.

NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

PRÁCTICA 8

INMUNOFLUORESCENCIA

INTRODUCCIÓN

Las inmunohistoquímicas son un conjunto de técnicas que permiten demostrar una gran variedad de antígenos presentes en las células o en los tejidos. Se basan en la capacidad que tienen los anticuerpos de unirse específicamente a sus correspondientes antígenos, siendo esta reacción visible por el hecho de que el anticuerpo utilizado está marcado (conjugado) con una sustancia que produce un color (cromógeno) o bien, con una sustancia que absorbe y emite luz (fluorocromo).

La fluorescencia se basa en la propiedad que tienen los fluorocromos de emitir luz de longitud de onda visible mientras son excitados con una determinada longitud de onda de luz ultravioleta. Durante este proceso el fluorocromo absorbe un fotón de alta energía, sufre una excitación electrónica y algunos de sus electrones son promovidos a orbitales moleculares de mayor energía, luego estos electrones decaen a orbitales de menor energía emitiendo luz de onda más larga (figura 1). Como ya se mencionó, en las técnicas de inmunofluorescencia los fluorocromos se utilizan para ser conjugados con anticuerpos, los más comúnmente utilizados son la fluoresceína y la rodamina.

El isotiocianato de fluoresceína (FITC) es muy estable, se combina con los grupos amino de las proteínas por uniones carbamido. Es excitado por la luz ultravioleta a una longitud de onda de 490nm y emite fluorescencia de un color verde-amarillento con una longitud de onda de 520nm (filtro azul). Este fluorocromo es el preferido para marcar, debido a que emite fluorescencia de un color al que el ojo humano es muy sensible y también porque el color verde-amarillento rara vez se encuentra en reacciones inespecíficas o de autofluorescencia en los tejidos.

Otros fluorocromos como el isotiocianato de tertametil rodamina (TRITC) se une a los grupos amino de las proteínas por grupos tiocarbamidas, es excitado por luz ultravioleta a una longitud de onda de 540nm (filtro verde) y emite fluorescencia roja-anaranjada de 570 nm de longitud de onda.



Figura 114. Modelo molecular de un fluorocromo excitado con un fotón de alta energía y emitiendo luz visible.

Existen dos métodos de inmunofluorescencia, el método directo (IFD) y el método indirecto (IFI). En la IFD, el antígeno es detectado por el anticuerpo marcado con el fluorocromo, mientras que en la IFI, el antígeno es detectado por un anticuerpo primario y posteriormente este último es detectado por el anticuerpo marcado (figura 2).

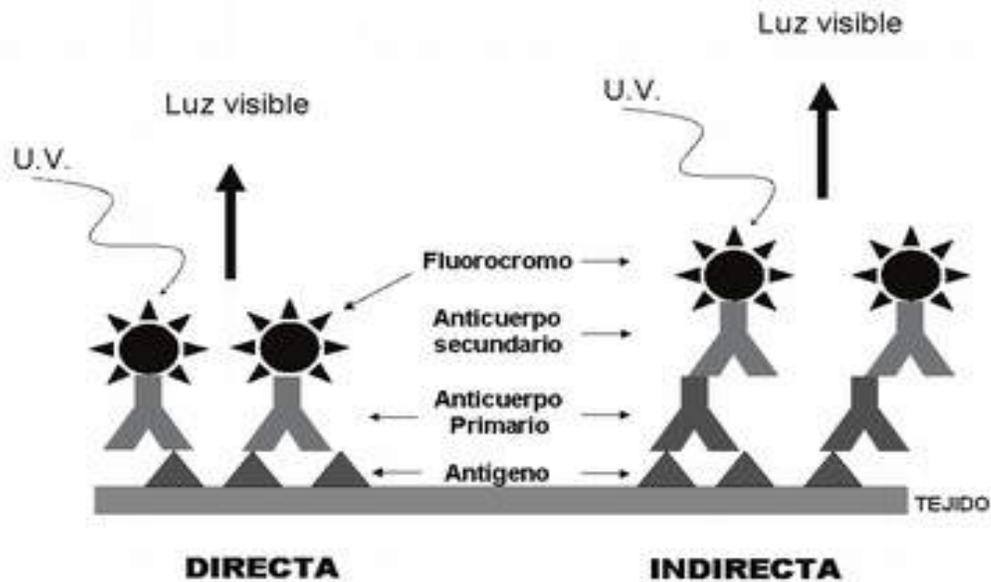


Figura 115. Tipos de inmunofluorescencia, directa e indirecta.

La IFD es un procedimiento en el cual, se aplica directamente en conjugado sobre la preparación que posee el antígeno. El anticuerpo del conjugado está dirigido contra el antígeno buscado y se forman complejos antígeno-anticuerpo en las zonas del tejido en donde se encuentra el antígeno, el fluorocromo es el encargado de hacer evidentes estas zonas al microscopio cuando es debidamente excitado.

La IFD se aplica comúnmente en el diagnóstico de enfermedades infecciosas como la rabia, la peste porcina clásica, la rinotraqueitis infecciosa bovina, la diarrea viral bovina y el distemper canino entre muchas otras. El diagnóstico consiste en demostrar la presencia de antígenos virales en cortes histológicos de tejidos congelados o en improntas de órganos, tejidos y mucosas (oral, conjuntival, vaginal, rectal, etc). Además, también es empleada para el diagnóstico de algunas enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico. Las muestras más empleadas en este tipo de pruebas son las muestras congeladas en nitrógeno líquido, en las que se preservan mejor los determinantes antigénicos, sin embargo, la morfología del tejido se observa poco definida a diferencia de la fijación con formol que confiere un mejor aspecto histológico pero requiere de la recuperación de los determinantes antigénicos. La fijación de los tejidos de las muestras congeladas se realiza una vez que han sido realizados los cortes histológicos, empleando para ello solventes orgánicos que permiten la permeabilización de la membrana tales como el alcohol metílico, etílico, la acetona o mezclas de ellos.

También la IFD muestra una extraordinaria sensibilidad además de que permite localizar con precisión antígenos intracelulares, o presentes en muy baja cantidad, es comparativamente con otras técnicas, rápida y sencilla de realizar. Sin embargo, entre las principales desventajas se encuentra la falta de permanencia de la fluorescencia, por lo que la lectura debe ser inmediata, requiere de equipo especializado (microscopio de epifluorescencia) y además el detalle morfológico es pobre, por lo que el personal a cargo de la interpretación de las pruebas también debe ser especializado en ello. Para la documentación de cada caso, es necesario fotografiar la reacción con sus respectivos controles de prueba.

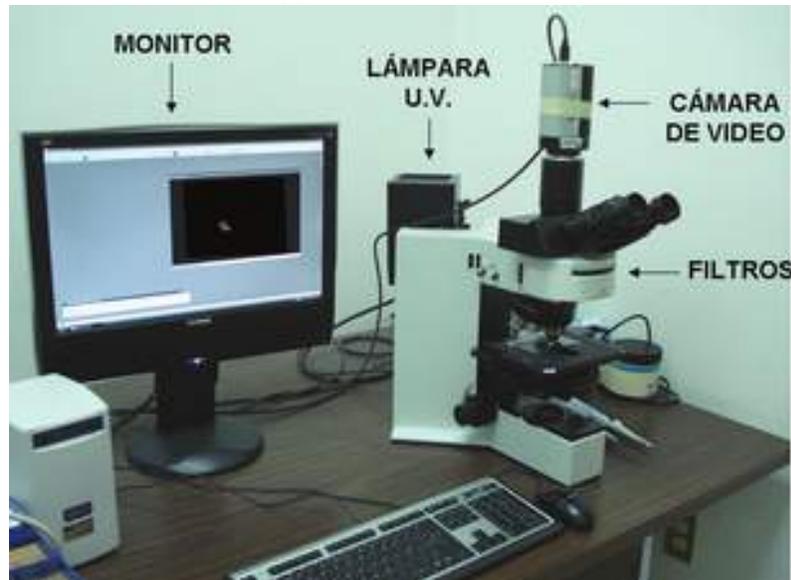


Figura 116. Microscopio de fluorescencia y sistema de captura de imágenes.

Por lo anterior la principal limitante de la inmunofluorescencia es la necesaria utilización de un microscopio de epifluorescencia (Fig. 116) el cual es de un costo significativamente más elevado que un microscopio óptico convencional. Este microscopio está dotado de una lámpara de vapor de mercurio a alta presión, dentro de una cámara de cuarzo, el cual es la fuente de emisión de luz U.V., el equipo también cuenta con una serie de filtros que por un lado sólo dejan pasar el rango de espectro de luz U.V. necesaria para la excitación del fluorocromo y por otro lado, protegen la vista del observador. A pesar del costo del equipo, una vez contando con este en el laboratorio, el costo de cada prueba resulta ser económico.

IFD PARA EL DIAGNÓSTICO DEL VIRUS DE DISTEMPER CANINO (VDC)

Aunque la vacunación contra el VDC ha sido empleada masivamente desde hace varias décadas, esta enfermedad actualmente es de gran importancia en casi todo el mundo. El virus se multiplica de manera inicial en macrófagos y células linfoides del aparato respiratorio y posteriormente en células de diversos órganos como los del aparato digestivo, urinario y el sistema nervioso central. El diagnóstico de la enfermedad se dificulta debido a la inespecificidad de los signos clínicos durante la infección. Rutinariamente ha sido utilizada la IFD a partir de improntas nasales, conjuntivales o vaginales para la demostración directa del VDC. Sin embargo, la

presencia del virus es factible únicamente dentro de las tres primeras semanas de la infección. El uso de otras pruebas como la serología está limitada, debido a la presencia de anticuerpos vacunales.

OBJETIVO

Conocer las técnicas de inmunofluorescencia, sus tipos, ventajas y aplicación en el diagnóstico veterinario.

ACTIVIDADES PREVIAS A LA PRÁCTICA

Lectura de la práctica número 8, correspondiente a inmunofluorescencia del Manual de prácticas de Inmunología Veterinaria

MATERIAL

BIOLÓGICO

Cortes histológicos congelados de encéfalo canino positivo a VDC

EQUIPO

Microscopio de inmunofluorescencia

Cámara húmeda

Micropipetas

Cubreobjetos

REACTIVOS

Buffer de montaje (Glicerol -PBS 10X en proporción 9:1)

Buffer de lavado PBS (buffer salino de fosfatos pH 7.2)

Conjugado específico (Canine Distemper Virus FITC Conjugate, VMRD Inc.).

DIVERSO

Recipiente de lavado

Toalla de papel

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

- 1.- En el corte histológico de la zona del tejido encefálico, colocar 100 µl de PBS e incubar a temperatura ambiente por 5 minutos.
- 2.- Eliminar el PBS decantándolo en la toalla de papel y a continuación colocar sobre el tejido 50 µl del conjugado (monoclonal anti-VDC conjugado con FITC). Para cada ensayo, debe hacerse un control de prueba paralelo consistente en la utilización de un corte histológico con la adición de PBS sin conjugado.
- 3.- Incubar 1 hora a 37° C en cámara húmeda.
- 4.- Decantar la solución del tejido y hacer tres lavados con 100 µl de PBS tres veces por cinco minutos cada lavado.
- 5.- Colocar al tejido 50 µl de la solución de montaje y posteriormente colocar cuidadosamente encima un cubreobjetos tratando de evitar la formación de burbujas, posteriormente secar el exceso de solución de las orillas y el reverso de la laminilla.
- 6.- Para la observación en el microscopio de epifluorescencia se debe exponer la preparación a luz U.V. utilizando en filtro de 490 nm (filtro azul) por mínimo tres minutos antes de la observación.

INTERPRETACIÓN DE LA PRUEBA

Se debe buscar la presencia de células fluorescencia intensa de localización intracitoplasmática (figura 117), estas pueden estar en grupos de células comúnmente. Se debe tener cuidado de diferenciar otras estructuras fluorescentes (artefactos) que no son indicativos de la presencia del antígeno. En todo el tejido es normal encontrar cierta fluorescencia, ya sea propia (autofluorescencia) o debida a una débil fijación de la fluoresceína de forma inespecífica (ruido de fondo) que debe ser adecuadamente reconocida en todos los casos. En los tejidos utilizados como controles debe haber ausencia de células marcadas con fluorescencia específica.

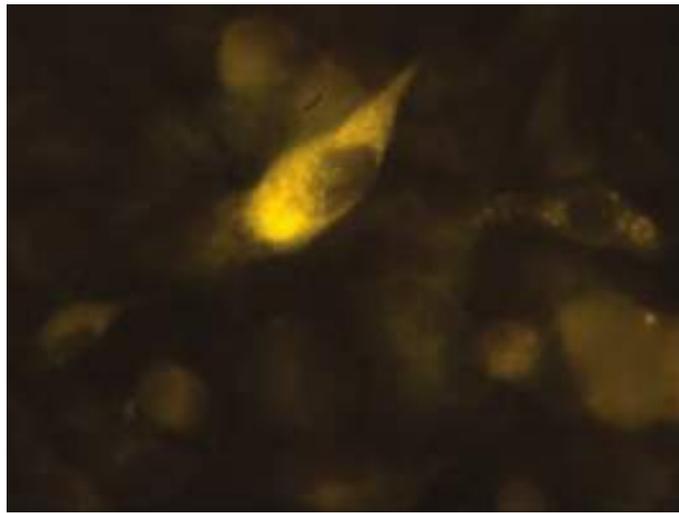
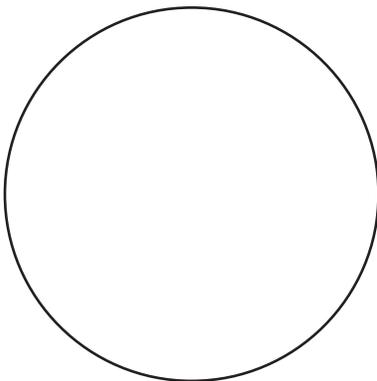


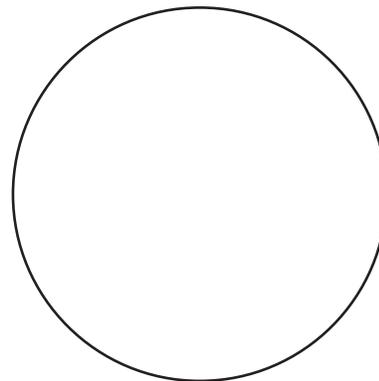
Figura 117. Línea celular DK13 teñida con el anticuerpo monoclonal Anti-CDV y célula con marca positiva.

TABLAS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

Esquematice lo observado



Muestra



Control de prueba

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

La solución fosfato buffer empleada para realizar los lavados de las laminillas será depositada en una toalla de papel, la cual será depositada en un contenedor plástico y almacenada para posteriormente remitirla a una empresa procesadora de residuos bioquímicos. De acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SE-MARNAT-SSA1-2002

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1.- ¿Cuáles son las sustancias más comúnmente utilizadas como fluorocromos en las pruebas de inmunofluorescencia?

2.- ¿Qué es un conjugado?

3.- ¿Cuáles son los tipos de inmunofluorescencia que existen?

4.- ¿Cuáles son las principales ventajas de las pruebas de inmunofluorescencia?

5.- ¿Cuál es la principal limitante de estas pruebas?

BIBIOGRAFÍA

Jozwik, A., Frymus, T. 2002. Natural Distemper in Vaccinated and Unvaccinated Dogs in Warsaw. *J. Vet. Med.* 49, 413–414.

Burnett, R., Guichard, Y., Barale, E., 1997. Immunohistochemistry for light microscopy in safety evaluation of therapeutic agents: an overview. *Toxicology* 119, 83-93.

Agudelo-Florez, P., Restrepo, M., Lotero, M.A., 2006. Evaluation of Indirect Immunofluorescence assay for diagnosis of human leptospirosis. *Biomédica*, 26, 216-223.

Vincent M, Rodeghiero C, Eylenbosch R, Mans Y, Swalus-Steenhouwer J, Piérard D, Huygen K, Vanhoof R. 2011. Pertussis Serodiagnosis in Belgium in the Period 1990-2009. *Clin Vaccine Immunol.* IN PRESS (doi:10.1128/CVI.00003-11).

Leonardi GP. 2010 Rapid identification of 2009 H1N1 influenza A virus using fluorescent antibody methods. *Am J Clin Pathol.* Dec;134(6):910-4.

NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infecciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

PRÁCTICA 9

PRUEBAS QUE DETECTAN INMUNIDAD CELULAR (INTRADERMOREACCIÓN)

INTRODUCCIÓN

La tuberculinización es la técnica normada de uso general, que se emplea para el diagnóstico de tuberculosis bovina en la República Mexicana, se basa en una reacción inmunológica denominada hipersensibilidad celular o tardía.

En los animales que han estado en contacto con esta bacteria, se desarrolla una reacción inflamatoria local y mediada por linfocitos T al cabo de unas 24-72 h. La respuesta está mediada por células T_H1, que se dirigen al sitio donde se inyectó el antígeno, éstas reconocen complejos de péptido CMH de clase II en las células presentadoras de antígeno y liberan citocinas inflamatorias como IFN- γ TNF- β , GM-CSF, quimiocinas (Figura 118).

Estas citocinas estimulan la expresión de moléculas de adhesión en el endotelio y aumentan la permeabilidad vascular local, lo que permite que el plasma y las células alcancen este sitio originando una hinchazón visible. Esta inflamación se caracteriza por: induración, infiltración en la lesión por células mononucleadas (macrófagos y linfocitos T), y en reacciones graves puede presentarse necrosis en el sitio de inyección.

El derivado proteico purificado (PPD) bovino empleado está elaborado a partir de *Mycobacterium bovis* cepa AN5, conteniendo 3,250 UI por dosis de 0.1 ml.; desarrollado sobre un medio sintético, precipitado por ácido tricloroacético y calibrado contra el estándar internacional de la OMS para tuberculina PPD bovina. La tuberculina contiene un estabilizador (glucosa), un preservante (fenol) y componentes salinos isotónicos.

PPD aviar que será utilizado en la prueba cervical comparativa, está elaborado con *Mycobacterium avium* cepa D4, conteniendo 5,000 UI por dosis de 0.1 ml. Debe contener como colorante el rojo de Ponceau, para distinguirla de la de PPD bovino que no lleva colorante.

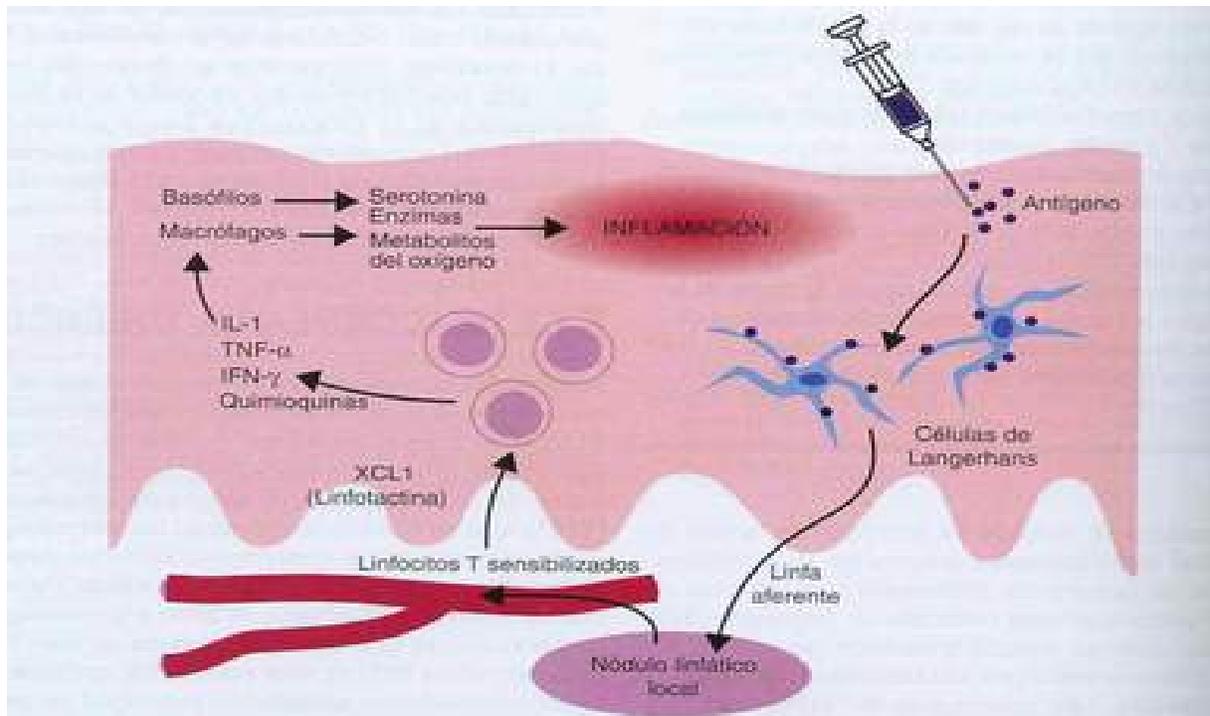


Figura 118. Reacción inmunológica de hipersensibilidad tardía.

OBJETIVO

Que el alumno conozca la prueba de tuberculina empleada en la "Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina" (*Mycobacterium bovis*).

MATERIAL

1. Jeringas de 1 ml con graduación de 0.1 ml (desechables, automáticas o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado).
2. Agujas hipodérmicas, calibre 24 a 29 de 0.5 a 1.5 cm de largo (desechables o en caso contrario limpias, esterilizadas y en buen estado).
3. Torundas impregnadas con alcohol

BIOLÓGICO

1. PPD bovino (*Mycobacterium bovis* cepa AN5, conteniendo 3,250 UI por dosis de 0.1 ml).
2. PPD aviar (*Mycobacterium avium* cepa D4, conteniendo 5,000 UI por dosis de 0.1 ml) para la prueba cervical comparativa.

EQUIPO

1. Cutímetro metálico o de plástico (1 vernier o pie de rey, graduado en mm).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Las siguientes pruebas de tuberculina, autorizadas por la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural Pesca y Alimentación, deben aplicarse a los bovinos a partir de los dos meses de edad por Médicos Oficiales y/o Médicos Veterinarios responsables aprobados:

- a) Prueba en el pliegue caudal
- b) Prueba cervical comparativa
- c) Prueba cervical simple

Para la aplicación de cualquiera de las pruebas, éstas deben realizarse de forma única y durante la inoculación en las 72 horas siguientes, no efectuarse otro tipo de manejos, como son el herrado, desparasitado, vacunación y otros, con el fin de no afectar los resultados.

a) PRUEBA EN EL PLIEGUE CAUDAL O PRUEBA INTRADÉRMICA ÚNICA (IDU)

Es la prueba de rutina, cuando se desconoce la situación zoonosanitaria en materia de tuberculosis de un hato o lote de ganado o como sustituto de la prueba cervical simple. Los bovinos sujetos a esta prueba, deben ser identificados oficialmente, dicha información será asentada por el médico veterinario responsable aprobado u oficial.

Las técnicas de manejo para la aplicación de tuberculina en el pliegue caudal consistirán en:

PROCEDIMIENTO

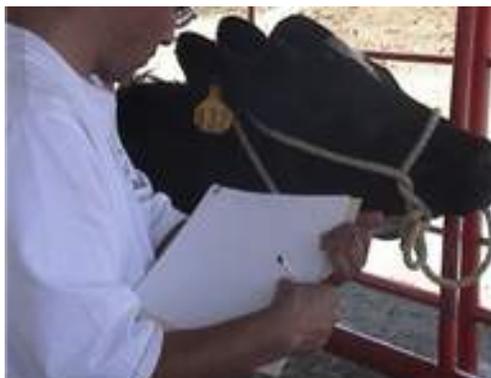


Figura 119. Identificación oficial del animal.



Figura 120. Medición del grosor de la piel en la zona caudal seleccionada.



Figura 121. Antisepsia de la zona por inocular.



Figura 122. Tomar 0.1 ml de PPD bovino.



Figura 123. Inoculación intradérmica en la zona medida de 0.1 ml del PPD bovino.

RESULTADOS

La lectura debe hacerse mediante la observación y palpación del sitio de la inoculación, realizándose a las 72 horas (\pm 6 horas) posteriores a la aplicación del biológico, asimismo el médico verificará que se trata de los mismos animales inoculados y registrados en la Hoja de Campo.

Las reacciones se clasifican como:

Negativa: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación.

Reactor: Cuando sea visible y/o palpable cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis o cualquier cambio por mínimo que sea en el sitio de aplicación.

b) PRUEBA CERVICAL COMPARATIVA

Prueba autorizada, para confirmar o descartar animales reactores a la prueba de pliegue caudal. Se podrá efectuar por única vez dentro de los 10 días naturales siguientes a la inoculación de la prueba caudal; o bien después de transcurridos 60 días naturales.

Esta prueba no debe ser utilizada en hatos, cuando el diagnóstico se haya obtenido por el aislamiento de *M. bovis* de las muestras de los animales sacrificados.

Previo a la realización de la prueba, el Médico Veterinario deberá contar con la documentación de la o las pruebas anteriores.

Para la aplicación de la tuberculina en la prueba cervical comparativa, se tomarán en cuenta las siguientes prácticas:

1. Rasurar dos áreas cuadrangulares de al menos 5 cm por lado.
2. El sitio de aplicación será en la cara lateral del cuello, en el tercio medio del cuello, esta zona es más sensible que en los pliegues anales, será aproximadamente de 10 cm debajo de la cresta, el sitio inferior será aproximadamente de 13 cm debajo de la anterior, esta prueba se aplica mediante la inoculación intradérmica de 0.05 ml de PPD aviar en el área rasurada superior y 0.1 ml de PPD bovino en la inferior.

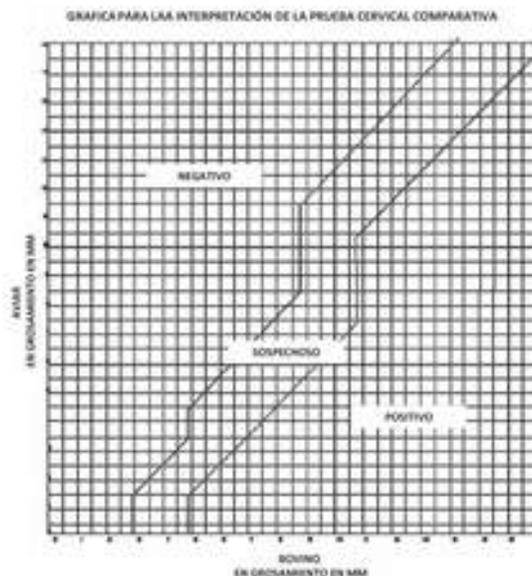
3. Previo a la inoculación, se levanta un pliegue de piel en el centro de cada una de las áreas rasuradas y se procederá a medir el grosor de éstas, utilizando el cutímetro, debiendo registrarse los valores en los formatos para prueba cervical comparativa.

RESULTADOS

La lectura de esta prueba se realizará 72 horas (+ 6 horas), midiendo con el cutímetro el grosor de la piel en el sitio de la aplicación, éstas serán anotadas en la hoja de control de campo prueba cervical comparativa, sustrayendo el valor de la primera lectura al de la segunda, el resultado final deberá redondearse según el siguiente ejemplo: de 6.2 baja a 6.0, 6.3 sube a 6.5; de 6.7 baja a 6.5; de 6.8 sube a 7; una vez realizada esta operación se procede a graficar los valores obtenidos tanto de PPD aviar como del bovino y el punto de intersección dará el resultado de la prueba. De acuerdo a la gráfica oficial, se interpretarán los resultados.

En el caso que la reacción de un animal, se clasifique según la gráfica como sospechoso en dos pruebas consecutivas, se clasificara como reactor a la prueba.

Gráfica 1



Tomada del diario Oficial de la Federación del 3 de Diciembre del 2007, con la propuesta de modificación a la NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina. (*Mycobacterium bovis*)

c) PRUEBA CERVICAL SIMPLE

Esta prueba se empleará inicialmente para probar hatos en los que se ha comprobado la existencia de *M. bovis*; por aislamiento bacteriológico o PCR, o bien, para probar ganado expuesto.



Figura 124. Para el rasurado de la zona, utilizar una navaja de doble filo.



Figura 125. Rasurado de la zona a inocular.



Figura 126. Medir el grosor de la piel con vernier.



Figura 127. Hacer antisepsia de la zona por inocular. Tomar 0.1 ml de PPD bovino.



Figura 128. Aplicar intradérmicamente 0.1 ml de PPD bovino.

RESULTADOS

La lectura se hace a las 72 ± 6 horas posteriores a su inoculación, mediante la observación y palpación del sitio en donde se practicó la inoculación.

Las reacciones se clasifican como:

a) Negativa: Cuando no se observe ni se palpe ningún cambio en la piel del sitio de aplicación.

b) Reactor: Cuando sea visible y/o palpable, cualquier engrosamiento, rubor, calor, dolor o necrosis o cualquier cambio por mínimo que sea en el sitio de aplicación.

Esta prueba puede ser sustituida por una prueba de pliegue caudal, después de haber obtenido la primera prueba cervical simple negativa en todos los animales probados del hato o, sin evidencia en el diagnóstico de laboratorio de los animales reactivos. Los animales reactivos a la prueba de pliegue caudal, no serán sometidos a la prueba cervical comparativa y cualquier reacción será considerada positiva.

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

En base a la NOM -087-SEMARNAT-SSA1-2002 Residuos peligrosos biológico infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo, la disposición de residuos se hará de la siguiente forma:

a) las torundas al no estar impregnadas de sangre se depositarán en la basura municipal y

b) las jeringas utilizadas se colocarán en el recipiente rígido de color rojo que tiene la leyenda de "Residuos peligrosos punzocortantes biológico infecciosos" y marcados con el símbolo universal de riesgo biológico.

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1. Define ¿cuándo se considera a un animal reactor?
2. Menciona los Estados de la República Mexicana libres de tuberculosis bovina.
3. ¿Qué otras pruebas, no inmunológicas, marca la NOM-031-ZOO-1995 para el diagnóstico de tuberculosis bovina?
4. Menciona otras 2 enfermedades en animales, además de la tuberculosis, en las que se aplican pruebas de intradermoreacción como método de diagnóstico.
5. Menciona 2 técnicas empleadas para medir la respuesta inmune celular además de la intradermoreacción.

BIBLIOGRAFÍA

Manual de actualización técnica para la aprobación del médico veterinario en tuberculosis bovina y brucelosis, SAGAR, FedMVZ México, Octubre 1995

[http://WWW.inifap.gob.mx/contenido/nuestra_institucion/SITUACION TUBERCULOSIS](http://WWW.inifap.gob.mx/contenido/nuestra_institucion/SITUACION_TUBERCULOSIS)

Tuberculosis: ¿una zoonosis re-emergente?, Abalos,P . Retamal,P. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz., 2004, 23 (2), 583-594.

NORMA Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).8 de marzo de 1996.

Modificación a la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995, Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).27 de agosto de 1998.

NORMA Oficial Mexicana de Emergencia NOM-EM-017-ZOO-2005, Campaña Nacional contra La Tuberculosis Bovina (*Mycobacterium bovis*).26 de julio de 2005.

Janeway, CH.Travers, P. Inmunobiología Capitulo 12 Alergia e Hipersensibilidad, 471-500, Ed. Masson 2ª edición, 2003.

Jasso Obregón, J.O. Manual de Normatividad y Regulación Zoosanitaria. Universidad Nacional Autónoma de Tamaulipas, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 23. Enero 2009.

Tizard, Ian R. Introducción a la Inmunología Veterinaria. Ed. Elsevier Saunders 10ª edición 2009.

NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

PRÁCTICA 10

ANÁLISIS INMUNOADSORBENTE LIGADO A UNA ENZIMA (ELISA)

INTRODUCCIÓN

ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay) es una técnica bioquímica utilizada principalmente en Inmunología para detectar la presencia de un antígeno o un anticuerpo en una muestra. Han sido una valiosa herramienta en la medicina para el diagnóstico de diversos estados patológicos o bien para la detección de cambios fisiológicos. La prueba de ELISA se basa en el uso de antígenos o anticuerpos marcados con una enzima, de forma que los conjugados resultantes tengan actividad tanto inmunológica como enzimática. Al estar uno de los componentes (antígeno o anticuerpo) marcado con una enzima e insolubilizado sobre un soporte (inmoadsorbente) la reacción antígeno-anticuerpo quedará inmovilizada y, por tanto, será fácilmente revelada mediante la adición de un sustrato y cromógeno específico que al actuar la enzima producirá un color observable a simple vista o cuantificable mediante el uso de un espectrofotómetro o un colorímetro .

APLICACIONES DE LA PRUEBA DE ELISA

Enfermedades producidas por parásitos:

Toxocara canis, Babesias, Tripanosomas, Toxoplasmosis, Triquinosis

Enfermedades producidas por Micoplasmas:

Neumonía Enzootica en cerdos

Enfermedades producidas por bacterias:

Mycobacterium tuberculosis, *Vibrio cholerae*

Brucelas, Enterotoxinas, Estreptococos. Salmonelas

Enfermedades producidas por virus:

Peste porcina africana, Peste porcina clásica, Rinotraqueitis infecciosa, Rotavirus
Artritis vírica

Otras aplicaciones:

Hormonas, Gonadotropin coriónica, Progesteron, Testosterona, Hormonas tiroi-
deas

Cuantificación de inmunoglobulinas:

IgG, IgE

Los tipos de ELISA se pueden resumir en dos grandes grupos:

- ELISA para detectar antígenos: ELISA Directa, ELISA sándwich.
- ELISA para detectar anticuerpos: ELISA indirecta, ELISA de Captura.

La fase sólida: debe ser de un tipo que permita un fácil manejo (especialmente en los procesos de lavado) y la reproducibilidad de la unión de antígenos o anticuerpos sobre su superficie. Las microplacas de 96 pocillos y un volumen de 350 μ L son especialmente ventajosas para procesar un elevado número de muestras y una vez tapizadas, el material inmovilizado permanece reactivo mucho tiempo siempre que se mantenga seco y a baja temperatura. Normalmente se utilizan microplacas de poliestireno de fondo plano que pueden adquirirse estériles y con o sin tapa.

Enzimas: La enzima escogida como marcador debe unirse fácilmente a antígenos y anticuerpos, encontrarse en estado puro a un precio razonable y tener un substrato cromogénico o fluorogénico conveniente y de fácil preparación. Las enzimas más utilizadas son fosfatas alcalina, peroxidasa de rábano y β -galactosidasa.

Las técnicas de ELISA se realizan mediante la adición secuencial de todos los reactivos necesarios separados por etapas de lavado. Cada una de las operaciones puede realizarse manualmente con micropipetas o con equipamiento para la automatización de todas y cada una de las etapas. Esta completa automatización se justifica por la necesidad de procesar y analizar un gran número de muestras y necesitar una elevada repetibilidad de resultados.

TIPOS DE ELISA

ELISA Directo

Consta de las siguientes etapas:

1.-Fijación al soporte insoluble ("tapizado") de antígenos específicos. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

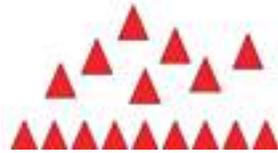


Figura 129

2. Adición de anticuerpos marcados ("conjugado") con una enzima; si los anticuerpos reaccionan con los antígenos, el complejo quedará solubilizado. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

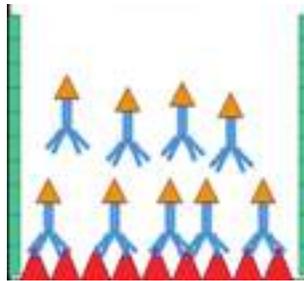


Figura 130

3. Adición de un sustrato y cromógeno sobre los que actúa la enzima, al finalizar la reacción enzimática y desarrollo de color, se puede detener con una solución de paro.

La lectura puede ser visual o mediante el uso del lector ELISA.

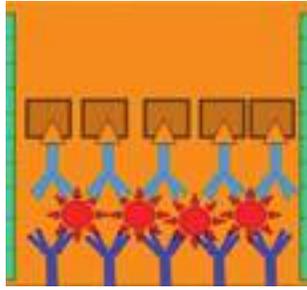


Figura 131

ELISA Sándwich "DAS" (Double Antibody Sandwich)

Consta de las siguientes etapas:

1. Fijación al soporte insoluble de anticuerpos específicos del agente patógeno a detectar. Lavado para eliminar los anticuerpos fijados deficientemente o no fijados.

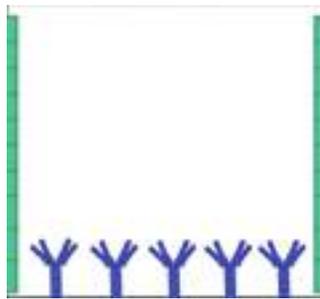


Figura 132

2. Adición de la muestra problema (sangre, suero, plasma) reaccionará específicamente con los anticuerpos fijados al soporte. Lavado para eliminar los antígenos que no hayan reaccionado y los restos de la muestra no fijados.

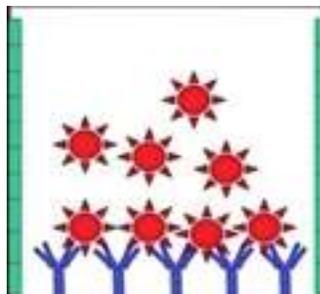


Figura 133

3. Adición de anticuerpos específicos del antígeno a detectar (deben tener un epítipo diferente de los anticuerpos con los que se han tapizado el soporte) con-

jugados con una enzima, los cuales reaccionan con los antígenos añadidos con la muestra problema y que se encuentran fijados a los anticuerpos.

Lavar para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

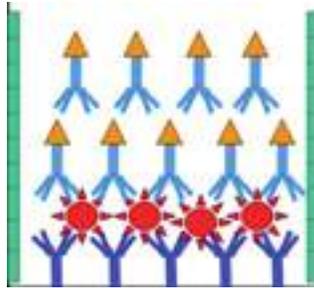


Figura 134

4. Adición de un sustrato y cromógeno sobre los que actúa la enzima, al finalizar la reacción enzimática y desarrollo de color se puede detener con una solución de paro.

La lectura puede ser visual o mediante el uso del lector ELISA.

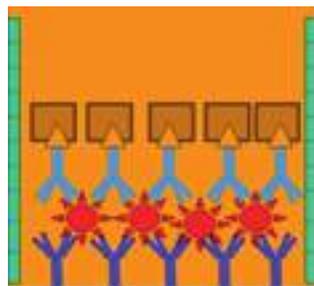


Figura 135

ELISA Indirecto

Consta de las siguientes etapas:

1.- Fijación al soporte insoluble de antígenos específicos para los anticuerpos objeto de estudio. Lavado para eliminar los antígenos fijados deficientemente o no fijados.

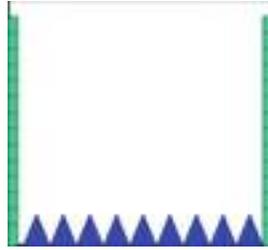


Figura 136

2.- Adición del suero problema, de tal forma que sus anticuerpos reaccionarán específicamente con los antígenos fijados al soporte. Lavado para eliminar los anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

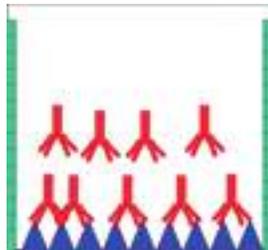


Figura 137

3.- Adición de anti-anticuerpos conjugados con una enzima, los cuales reaccionan con los anticuerpos específicos añadidos en el paso anterior y que se encuentran fijados a los antígenos. Lavado para eliminar los anti-anticuerpos marcados que no hayan reaccionado.

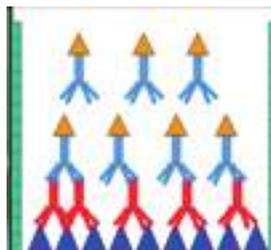


Figura 138

4.- Adición de un sustrato y cromógeno sobre los que actúa la enzima, al finalizar la reacción enzimática y desarrollo de color se puede detener con una solución de paro.

La lectura puede ser visual o mediante el uso del lector ELISA.

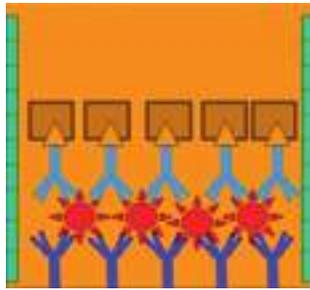


Figura 139

ELISA Competitivo

Consta de las siguientes etapas:

1.- Incubación del Anticuerpo problema con el antígeno específico fijado a la placa. Lavado para eliminar anticuerpos no fijados al antígeno.

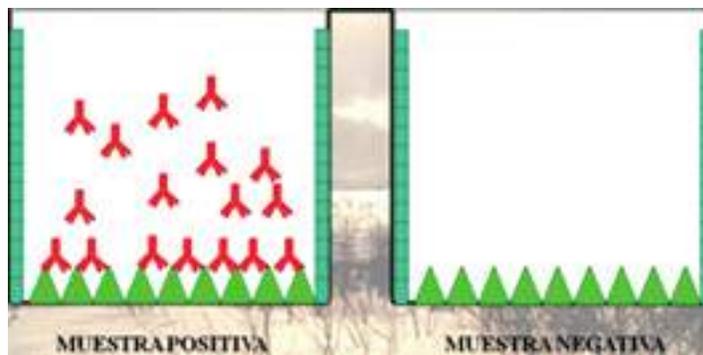


Figura 140

2. Incubación de un anticuerpo marcado específico contra el antígeno. Lavado para eliminar anticuerpos no fijados al antígeno.

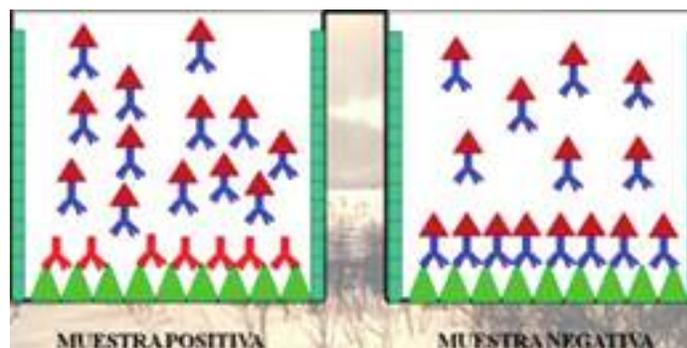


Figura 141

3. Adición de un substrato sobre el que sea capaz de actuar la enzima marcada. Se puede parar la reacción si se desea.

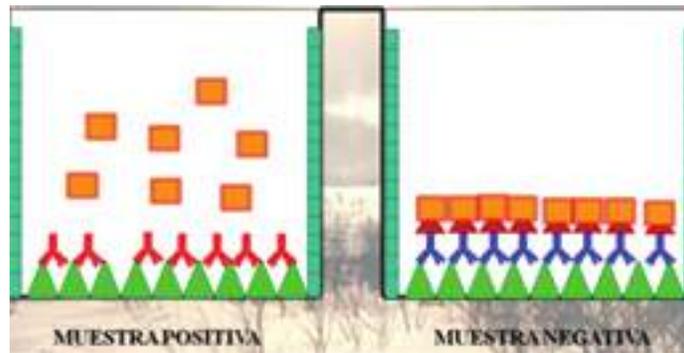


Figura 142

4.-Lectura visual o colorimétrica del producto final coloreado de ambas pruebas y comparar los resultados. Una muestra positiva no generaría reacción de color, mientras que una muestra negativa si habría cambio de color.

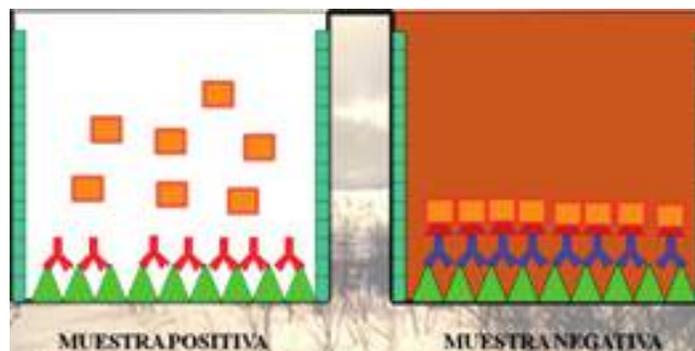


Figura 143

LECTURA E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Una de las grandes ventajas de la técnica ELISA es la posible automatización de la lectura y, por lo tanto, su objetividad. Dicha automatización se puede conseguir con un simple colorímetro o espectrofotómetro de cubeta o con sofisticados equipos de lectura automática de microplacas.

Los resultados finales de la lectura colorimétrica se reflejan numéricamente mediante valores de absorbancia o densidad óptica que se obtendrán a la longitud de onda más adecuada para la coloración final alcanzada.

OBJETIVO

Que el alumno conozca los fundamentos de las técnicas de ELISA, así como su aplicación clínica.

MATERIAL

REACTIVOS

- Kit comercial para la prueba de ELISA.(será proporcionado por el Profesor instructor)

BIOLÓGICO

- Sueros problema

EQUIPO

- Micropipetas de 20, 100,200 y 1 000µls para servir las muestras y los reactivos. .

- Lector de ELISA

PROCEDIMIENTO

Preparación de los sueros: Los sueros a probar (sueros problema) serán diluidos 1/40 (ejemplo a 10µl de suero se le adiciona 390µl de diluyente). Cambie la punta de la micropipeta por cada uno de los sueros a diluir.

A todos los reactivos se les debe permitir ponerse a temperatura ambiente 20°-25°C, antes de su uso. Los reactivos deben homogenizarse agitándolos suavemente.

Pasos generales de un ELISA Indirecto

- 1.- En la placa adsorbida con el antígeno, registrar la posición de las muestras.
- 2.- Poner 100 µl de control negativo en los pocillos A1 y B1. El control está listo para su uso, no se requiere dilución.
- 3.- Poner 100 µl de control positivo en los pocillos C1 y D1. El control está listo para su uso no se requiere dilución.
- 4.- Poner 100µl de cada uno de los sueros diluidos en los pocillos apropiados. Es aconsejable poner los sueros por duplicado.
- 5.- Incubar 30 min. a temperatura ambiente 20^o-25^oC.
- 6.- Aspire el contenido de cada uno de los pocillos y deséchelo en un apropiado contenedor.
- 7.-Lavar cada pocillo con aproximadamente 300 µl de solución de lavado de 3 a 5 veces. Aspirar el contenido de todos los pocillos después de cada lavado. Evitar que la placa se seque entre los lavados y antes de añadir el conjugado. Después de la última aspiración del líquido sacudir el líquido residual de cada placa en material absorbente de forma suave pero firme.
- 8.- Poner 100 µl de un anti-IgG: HRPO conjugado en cada uno de los pocillos. Incubar a temperatura de 20^o-25^oC.
- 9.- Repetir los pasos 6 y 7
- 10.- Poner 100 µl de solución de sustrato TMB en cada pocillo de prueba. Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos a 20^o-25^oC.
- 11.- Poner 50 µl de solución de paro en cada pocillo para detener la reacción.
- 12.- Mida y registre los valores de absorbancia (densidad óptica) por cada uno de los pocillos a la densidad especificada en el kit (450 o 650 nm) usando un lector ELISA (espectrofotómetro).
- 13.- Calcular los resultados.

El cálculo de los resultados se hará de acuerdo a las especificaciones del kit proporcionado.



Figura 144.
A) Agregando el conjugado.



Figura 145.
B) Realizando lavado.



Figura 146.
C) Después de incubar.

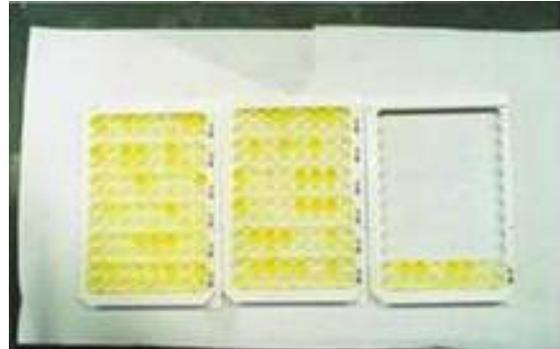


Figura 147.
D) Lectura de los resultados en lector de ELISA (espectrofotómetro).



Figura 148. Algunas etapas de la prueba de ELISA.

TRATAMIENTO Y DISPOSICIÓN DE RESIDUOS

- Las puntas para micropipeta se colocaran en un frasco, conteniendo un desinfectante (cloro al 1%).
- Las placas de ELISA utilizadas se colocarán en una solución desinfectante (cloro al 1%) para su posterior destrucción en el incinerador.

Anota los resultados obtenidos de tus sueros problema.

Cuadro 20

Suero	Densidad Óptica	Interpretación
1		
2		
3		

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1 .Menciona 3 enfermedades de campaña que emplean la técnica de ELISA.

2. Además de la prueba de ELISA menciona tres pruebas consideradas como de fijación primaria.

3. Menciona 3 enzimas y sus sustratos respectivos empleados y los colores que dan al terminar la reacción.

4. Menciona tres kits comerciales de ELISA para el diagnóstico rápido de enfermedades en pequeñas especies que puedan adquirirse en México.

5. Menciona tres kits comerciales de ELISA empleados para el diagnóstico de las enfermedades de campaña.

BIBLIOGRAFÍA

Ternyinc T. Y Avrameas S. Técnicas Inmunoenzimáticas. Editorial Iberoamericana. México 1989.

Lynch, J., Raphael, S., Mellor, D., Spare, P. y Inwod, M. Métodos de laboratorio. Nueva Editorial Interamericana. México. 1977.

Coll J. Técnicas de Diagnóstico en Virología. Ediciones Díaz de Santos. España 1993.

ZOLA, Heddy. Laboratory Methods in Immunology. Volume I. CRC Press, Inc. USA, 2000

Lequin R.M. History of Enzyme Immunoassay (EIA)/Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA). Clinical Chemistry. 2005; 51:12, 2415–2418. 141

OIE, 2003. Resolution XXIX: OIE Procedure for Validation and Certification of Diagnostic Assays (Test Methods) for Infectious Animal Diseases, Paris, ftp://ftp.oie.int/F_Reso_2003%20WP.pdf. Last access: January, 2006.

PRÁCTICA 11

ELABORACION DE UNA BACTERINA

INTRODUCCIÓN

En la medicina veterinaria, son fundamentales las buenas prácticas de manejo y las buenas prácticas clínicas, la profilaxis y no la terapia de los padecimientos da la diferencia entre una explotación productiva y una improductiva. La prevención de las enfermedades, se puede llevar acabo de manera pasiva, mediante la transferencia de inmunoglobulinas a los individuos utilizando sueros heperinmunes, o de manera activa; mediante el uso de productos biológicos inmunizantes (vacunas, bacterinas o toxoides).

Las medidas de bioseguridad implementadas en una explotación pecuaria, incluyen la profilaxis pasiva, la cual es cara y de eficiencia dudosa. Debe ser utilizada solamente en casos muy especiales, tales como la protección de animales muy jóvenes o muy valiosos, o en presencia de una enfermedad intratable, para proteger a la población bajo riesgo de contagio. Por otro lado, la inmunización activa mediante el uso de vacunas, bacterinas o toxoides es barata y eficaz, y se utilizan de rutina en la protección de todo tipo de animales contra las enfermedades infecciosas más comunes y en las diversas regiones geográficas.

Existen tres tipos principales de productos biológicos inmunizantes: **Vacunas** que se elaboran con virus muerto (inactivado) y aquellas preparadas con bacterias, virus vivo atenuado, modificado ó algunas proteínas o fragmentos antigénicos específicos, **Bacterinas** y **Toxoides**.

VACUNAS

a. Vacunas con virus muerto (inactivado).

Consisten de virus generalmente cultivados en tejidos o en huevos embrionados que han sido químicamente inactivados con formalina o beta-propiolactona. Estas vacunas contienen un adyuvante que las hace más inmunogénicas.

b. Vacunas vivas atenuadas y modificadas.

En el caso de las bacterias, se les llama así a los preparados que contienen agentes vivos con virulencia disminuida (atenuadas) generalmente por restricción de nutrientes o por adición de inhibidores de crecimiento.

En el caso de los virus, se denomina de esta manera a todos los preparados con virus vivo atenuado ó modificado, según el caso. La atenuación ó modificación de las partículas virales se efectúa por el cultivo seriado del agente en cultivos celulares, en huevos embrionados o en animales de laboratorio. En esta clasificación se agrupan la mayoría de vacunas utilizadas en medicina veterinaria.

En algunos padecimientos, se pueden utilizar vacunas vivas virulentas (de virus o bacterias), que no provocan la enfermedad pero se inoculan por vía diferente de la utilizada por la infección natural. Todos estos productos que utilizan agentes vivos, provocan mejor inmunidad pero son difíciles de manejar en condiciones de campo y presentan el problema de la creación de animales portadores sanos (ectima contagioso caprino).

En la actualidad existen una gran gama de productos inmunizantes de nueva generación desarrollados con el fin de ofrecer en el mercado veterinario productos más seguros y eficaces, entre estas tenemos:

- Vacunas derivadas de la ingeniería genética (vacunas recombinantes, subunitarias y deletadas).
- Vacunas anti-idiotipo.
- Vacunas de péptidos sintéticos.
- Vacunas de ADN.

BACTERINAS

Se les llama así a las suspensiones de bacterias patógenas muertas que se utilizan para inmunizar a los animales. Son la forma más común de inmunización contra agentes bacterianos, aunque no proporcionan una inmunidad duradera. Además de esto estimulan solamente una respuesta humoral y no celular, lo cual no es siempre efectiva para proteger un animal.

TOXOIDES

Se les llama así a las toxinas que, sea por calentamiento, envejecimiento o por acción del formol, han perdido su poder tóxico, reteniendo al mismo tiempo sus características antigénicas. Estos sólo se utilizan como prevención contra aquellas enfermedades en las cuales las lesiones son producto exclusivo de la toxina, más no de la acción directa de la bacteria que las secreta.

La eficacia de los productos biológicos inmunizantes varía dependiendo de:

1. El microorganismo en cuestión: algunos microorganismos son más antigénicos que otros.
2. Edad del animal: los animales muy jóvenes o muy viejos no responden con la misma intensidad que los animales de edades intermedias.
3. Estado fisiológico: los animales enfermos al igual que los desnutridos, responden pobremente a la inmunización.
4. Tipo de inmunidad: las bacterinas y las vacunas a virus muerto, estimulan la producción de inmunidad humoral y ésta no protege contra ciertas enfermedades.
5. Uso de Adyuvantes: son sustancias que aumentan inespecíficamente la antigenicidad de un preparado, estimulando preferentemente inmunidad de tipo celular.
6. Vía de inoculación: existen vías de inoculación que determinan la intensidad y la naturaleza de la respuesta obtenida (Cuadro 22).

ADYUVANTES

Son sustancias que actúan inespecíficamente intensificando la respuesta del animal al antígeno, existen tres tipos principales:

Aceites: poco utilizados en la práctica, ya que pueden producir considerable irritación, son sin embargo los más eficaces. Pueden ser simplemente aceites (generalmente minerales) tal como el Nujol, o pueden ser combinaciones de varios aceites en agua, como el adyuvante de Freund completo que lleva además un cultivo *Mycobacterium sp.* muerto, que hace de este adyuvante el más poderoso, pero también el más irritante.

Geles: algunos geles, tal como el hidróxido de aluminio, estimulan una fuerte respuesta inmune, siendo al mismo tiempo poco irritante. Por esta razón se utilizan ampliamente en preparados comerciales.

La acción de los adyuvantes oleosos, y de los geles obedece a tres razones principales:

- La liberación del antígeno se efectúa mucho más lentamente, provocando así un estímulo antigénico duradero.
- Los aceites y las ceras de la pared celular de *Mycobacterium sp.*, tienen una poderosa actividad quimiotáctica para los macrófagos que son atraídos en gran número al sitio donde se depositó el antígeno.
- Eventualmente se desprenden pequeñas gotitas de adyuvante con antígeno que se depositan en otros lugares del organismo, produciendo así nuevos focos de estimulación.

Toxinas de Gram: Estas representan pedazos de la pared celular de estas bacterias y producen su efecto adyuvante aun si no van unidas con el antígeno, o si éste se inocula en una zona diferente del organismo. El mecanismo de acción no se conoce con exactitud.

Cuadro 21
VÍAS DE INOCULACIÓN

VIA		RESPUESTA
Intradérmica	(ID)	No se usan para inmunizar, sirve para pruebas diagnósticas del tipo de la tuberculina.
Subcutánea	(SC)	No muy eficaz con antígenos solubles. Es muy eficiente con antígenos particulados, ya que la zona es muy rica en macrófagos pero no en polimorfonucleares. Metabolización lenta.

Intramuscular	(IM)	Similar a la subcutánea. Puede causar irritaciones locales que dificulten el movimiento al músculo involucrado.
Intraperitoneal	(IP)	Poco eficaz. El antígeno es rápidamente alcanzado por células polimorfonucleares y no por macrófagos. Metabolización rápida.
Intravenosa	(IV)	Similar a la vía IP.
Oral	(O)	Para estimular inmunidad local (IgA). Sólo en infecciones predominantemente entéricas.
Respiratoria	(R)	Para estimular la inmunidad local (IgA). En infecciones pulmonares.
Ocular	(OC)	Para inmunizar rápidamente gran número de animales (aves).

OBJETIVOS

1. El alumno conocerá los diversos tipos y mecanismos de acción de los diferentes productos biológicos inmunizantes que se emplean en la prevención de enfermedades en los animales domésticos.
2. Elaborar una bacterina autógena utilizando una cepa de campo de *Pasteurella multocida*, tomando como referencia las especificaciones de producción menciona-

das en la Norma Oficial Mexicana NOM-049-ZOO-1995 "Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurelosis neumónica bovina producida por *Pasteurella multocida* serotipos A y D".

ACTIVIDADES PREVIAS A LA PRÁCTICA

El alumno requiere haber leído sobre el tema de vacunas, así como haber consultado la Norma Oficial Mexicana NOM-049-ZOO-1995

MATERIAL

BIOLÓGICO

5 ml de cultivo bacteriano de *Pasteurella multocida* en una concentración de 1×10^8 (medio BHI).

REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Formol al 0.2%.

Solución estéril de Cloruro de Aluminio (ALCl) al 10%.

Solución estéril de Hidróxido de Sodio (NaOH) al 10%.

1 tubo de ensaye con 12 ml de agua destilada estéril.

1 Medio de agar BHI.

MATERIAL

4 pipetas de 1 ml (1/10).

1 juego para tinción de Gram.

2 tubos de ensaye de 10 ml estériles para centrifuga.

- 2 Viales de color ámbar estériles
- 1 Asa de inoculación
- 1 Mechero Bunsen
- 1 frasco con desinfectante y franela
- 1 jeringa de 3 ml estéril
- Tiras reactivas de pH
- Nefelómetro de MacFarland
- Centrífuga

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El protocolo de fabricación de nuestra bacterina autógena "Autobacterina", tomará como base lo establecido en las siguientes Normas Oficiales Mexicanas:

- Norma Oficial Mexicana NOM-049-ZOO-1995 "Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurelosis neumónica bovina producida por *Pasteurella multocida* serotipos A y D".
- Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1999 "Especificaciones para los biológicos empleados en la prevención y control de las enfermedades que afectan a los animales".

PROTOCOLO DE FABRICACIÓN

1. Inactivar el cultivo de *Pasteurella multocida* tipo D, adicionando formol en una concentración final de 0.2 a 0.4 %.
2. Incubar el cultivo formolizado a 37° C. Durante 30 minutos.
3. Tomar una asada del cultivo e inocular la mitad de una placa de agar BHI, incubar 24 horas a 37°C para constatar la inactivación de la bacteria, (corresponde a la prueba de esterilidad).

4. Realizar una tinción de Gram al cultivo para determinar la morfología y afinidad del cultivo bacteriano (corresponde a la prueba de pureza del cultivo).
5. Centrifugar el cultivo bacteriano a 2000 rpm por 10 minutos para obtener la biomasa.
6. Desechar el sobrante y sustituirlo por una cantidad igual de agua destilada o agua inyectable estéril.
7. Centrifugar nuevamente el cultivo bacteriano a 2000 rpm por 10 minutos.
8. Desechar el sobrante y adicionar agua destilada estéril hasta obtener una opacidad igual a la del tubo control 1×10^8 (Fig. 149) del Nefelómetro de MacFarland.
9. Con la finalidad de incorporar el adyuvante, adicionar a tu cultivo bacteriano una solución estéril de Cloruro de Aluminio 10% a razón de 46.6 ml/litro de cultivo y homogenizar bien el preparado.
10. Calibrar el pH a 7.0 utilizando tiras reactivas o potenciómetro (Fig. 150). Esto se logra adicionando gota a gota una solución estéril de Hidróxido de Sodio al 10%.
11. Envasar el producto terminado en viales de 3 ml. Identificar los viales con los siguientes datos: Bacterina *Pasteurella multocida*, fecha de elaboración, número de equipo y grupo.
12. Tomar una muestra del producto terminado e inocular la otra mitad de la placa de agar BHI, incubar 24 horas a 37°C para constatar la inactivación de la bacteria.
13. Realizar pruebas de seguridad y potencia según los protocolos.

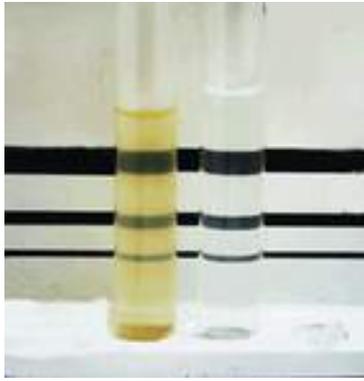


Figura 149. Tubo del Nefelómetro de MacFarland 1×10^8



Figura 150. Parámetros de color para calibrar el pH.

TRATAMIENTO Y DISPOSICION DE RESIDUOS

1. Los sobrenadantes del cultivo bacteriano deben depositarse en el frasco o recipiente que contiene desinfectante para posteriormente ser esterilizados e incinerados.

2. Las cajas de Petri y los tubos de ensaye utilizados durante la práctica, deben colocarse en el recipiente o contenedor correspondiente para ser esterilizados y posteriormente incinerados (de acuerdo a la Norma Oficial Mexicana NOM-087-SE-MARNAT-SSA1-2002).

TABLAS DE RESULTADOS EXPERIMENTALES

1. Registre la morfología bacteriana y la afinidad de los microorganismos a la tinción de Gram, debe observar sólo bacilos Gram negativos con tinción bipolar (prueba de pureza).

2. Registre el crecimiento bacteriano después de incubar la placa de agar BHI 24 horas a 37°C (prueba de esterilidad).

CUESTIONARIO DE EVALUACIÓN

1. ¿Qué es una bacterina?
2. ¿Qué tipo de inmunidad induce la inmunización con bacterinas?
3. ¿Cuál es la finalidad de adicionar un adyuvante en la elaboración de bacterinas?
4. Para que se realizan las pruebas de esterilidad y pureza?
5. Cual vía de inoculación se utiliza para la aplicación de bacterinas y por qué ?

BIBLIOGRAFÍA

Abbas AK, Lichtman AH, editores. Inmunología celular y molecular. 5a ed. España: ELSEVIER, 2004.

Code Federal Regulations, Animals and Animal Products. Part 9. Revised as of January 1995.

Manual of Standars for Diagnostic Test and Vaccines, Office International Des Epizooties, World Organisation for Animal Health, Paris, France. 1997.

Norma Oficial Mexicana NOM-049-ZOO-1995, Requisitos mínimos para las bacterinas empleadas en la prevención y control de la pasteurelosis neumónica bovina producida por *Pasteurella multocida* serotipos A y D. Publicada en el DOF el 03 de marzo de 1997.

Norma Oficial Mexicana NOM-063-ZOO-1993, Especificaciones que deben cumplir los biológicos empleados en la prevención y control de enfermedades que afectan a los animales domésticos. Publicada en el DOF el 02 de junio de 2003.

Tizard IR, editor. Veterinary immunology. An Introduction. 10a ed. USA: SAUNDERS, 2009

NOM-087-SEMARNAT-SSA1-2002 Protección ambiental-Salud ambiental-Residuos Peligrosos Biológico-Infeciosos-Clasificación y especificaciones de manejo.

