



MANUAL DE PRÁCTICAS DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA





CONTENIDO

	Página
I. PRESENTACIÓN	4
II. PRÁCTICAS	
1. Reconocimiento de órganos linfoides en animales vertebrados	5
2. Colección de sangre para obtener suero sanguíneo	8
3. Obtención de leucocitos mononucleares por concentración En Ficoll-Hypaque a partir de sangre venosa de bovino	10
4. Identificación de linfocitos T de bovino por el fenómeno de roseta con eritrocitos de ovino	12
5. Inmunización de un conejo con antígeno inactivado De <i>Bordetella bronchiseptica</i>	14
6. Evaluación de la inmunidad pasiva en el neonato	16
7. Prueba de aglutinación	19
8. Evaluación de la reacción de hipersensibilidad IV	22
9. Prueba de hemoaglutinación e inhibición de la hemoaglutinación	26
III. BIBLIOGRAFÍA	29
IV. ANEXOS	
Preparación de reactivos y soluciones	30
V. ACTUALIZACIÓN	31





I. PRESENTACIÓN

En el medio ambiente existe contiene una gran variedad de microorganismos infecciosos que pueden causar infección si estos se adhieren y se multiplican en los tejidos hasta llegar a causar enfermedad y o muerte del hospedador. Las infecciones son de curso variable y pueden ocasionalmente causar daño al sistema inmune.

El sistema inmunocompetente desde el punto de vista funcional tiene dos divisiones: el sistema de inmunidad innata y el sistema inmune adaptativo. El papel de la resistencia natural o inmunidad innata o inespecífica: actúa como la primera línea de defensa contra agentes infecciosos y potencialmente contra patógenos que son detectados antes de que ellos se establezcan y desencadenen una infección, por otro lado si este mecanismo de defensa es rebasado se desarrollará una resistencia específica con sus dos ramas: inmunidad humoral e inmunidad celular específica ante el microorganismo específico.

En estas prácticas de laboratorio, de forma básica e introductoria se pretende dar las bases para despertar el interés a la pregunta de cómo funcionan las proteínas producidas por células altamente especializadas del sistema inmunitario y su importancia en la identificación específica de la reacción antígeno y anticuerpo.

Este manual describe las prácticas de laboratorio y pretende ser una guía para que el estudiante comprenda el papel de estas reacciones *in vitro* e *in vivo* de los agentes de interés veterinario en algunos casos aplicables a la vigilancia epidemiológica.





II. PRÁCTICAS

PRÁCTICA 1: *Reconocimiento de órganos linfoides en animales vertebrados*

1.1 Introducción

El sistema inmune integra órganos y células que participan en la respuesta inmunitaria, comprende órganos linfoides primarios o generadores como son la médula ósea, el timo y la bolsa de Fabricio, y órganos linfoides secundarios o periféricos que están poblados por los linfocitos y células presentadoras de antígeno entre los cuales tenemos al bazo, ganglios o nodos linfáticos, tonsilas, placas de Peyer y grupos de células linfoides en la mucosa respiratoria, digestiva, urinaria y conjuntival principalmente, sitios en donde se inicia la respuesta inmune al reconocer a antígenos extraños que de forma espontánea o deliberada ingresan al organismo.

1.2 Objetivo

Identificar y reconocer los órganos linfoides primarios y secundarios en mamíferos, aves y en peces.

1.3 Material

Biológico

- Un conejo al destete de 4 a 5 semanas de edad
- Un pollo de 2 a 3 semanas de edad
- Una trucha arcoíris de aproximadamente 250 g de peso vivo

Medicamentos empleados para la eutanasia

- Acepromacina (AC) solución 0.5% frasco de 10.0 mL.
- Xilacina (XC) solución al 2% frasco de 10 mL.
- Pentobarbital sódico (PB) en solución al 6.2% frasco de 50.0 mL.
- Tabletas de ácido acetil salicílico (AO) 500 mg en base de ácido cítrico y bicarbonato de sodio.

Médico quirúrgico

- Jeringas desechables de 3.0 mL con agujas calibre 18, 22 y 24 mm de largo.
- Torundas de algodón en alcohol al 70%.
- Estuche de disección

Bioseguridad

- Cubrebocas
- Bata de laboratorio
- Guantes para cirujano
- Botas de hule





Condiciones de la práctica

La práctica se desarrollará en la sala de necropsias del CIESA.

El alumno deberá conocer previamente los procedimientos de necropsia de las aves, mamíferos y peces recomendados en la bibliografía de la práctica.

La sujeción y eutanasia se realizará bajo los criterios de la bioética y lo establecido en la NOM-033-ZOO-1995.

1.4 Técnica de eutanasia

Ave: Extender y sujetar el ala para administrar en la vena braquial una solución de PB a razón de 124 mg/Kg de peso vivo usando una jeringa de 2.0 mL con aguja calibre 22mm. Otra forma alterna es inyectar por vía intracardiaca, sujetando al ave en posición decúbito ventral con alas abiertas y con el dedo índice, localizar el fondo de la cavidad torácica para dirigir la jeringa con aguja calibre 18mm, en la unión de las clavículas a un eje medial y ligeramente hacia la derecha, succionar y extraer sangre e inmediatamente inyectar la solución de PB 62mg/Kg. La flacidez del ave confirma la muerte de la misma. Sumergir el animal en una cubeta plástica conteniendo agua y detergente para mojar las plumas y proceder para realizar la necropsia y el reconocimiento de los órganos linfoides.

Conejo: Colocar al animal en un cajón sujetador, colocar un gancho que pase por arriba y atrás del cuello del animal, administrar intramuscularmente la solución AC a una dosis de 0.05mg/Kg., utilizando jeringa y aguja calibre 22., al inducir la sedación del animal, se procede a desinfectar una de las orejas con torunda en alcohol al 70% para resaltar la vena auricular e inyectar por vía intravenosa solución de PB a una dosis de 62 mg/Kg con aguja calibre 24mm. Al desvanecer el animal, se retira del sujetador y se procede a realizar la necropsia en la mesa de trabajo.

Pez: En una cubeta de plástico colocar al pez con aproximadamente 2L de de agua, agregar 5 tabletas de AO para la formación de burbujas de CO₂ por algunos minutos y cuando el animal este sin movimiento y en posición decúbito lateral extraer el pez, colocarlo sobre un paño de algodón en la mesa hasta que cese el movimiento opercular y el cuerpo se encuentre totalmente flácido. De manera alternativa se puede utilizar 1 mL., de XA por el volumen de agua presente en la cubeta y dejar reposar al pez por 10 minutos, posteriormente se sigue el procedimiento anterior.

Siguiendo el procedimiento de necropsia para ave, conejo y el pez, se favorece la disección y el reconocimiento de los órganos linfoides. En el ave, sobre el cuello entre el esófago y la tráquea se distribuyen el timo en nódulos con forma de rosario, en cavidad abdominal cerca de la molleja se localiza el bazo con forma redondeada y de color ligeramente purpura, en el mesenterio intestinal se aprecian los nódulos linfoides, sobre la mucosa del yeyuno e íleon se podrán identificar las placas de Peyer, en la convergencia de los ciegos y porción distal del intestino delgado se aprecian a cada lado dos divertículos que corresponden a las tonsilas cecales, la bolsa de Fabricio se localiza en la cavidad pélvica sobre la porción dorsal de la cloaca, de forma esférica y consistencia suave.

En el conejo en la región submandibular subcutáneamente se observan los linfonodossubmandibulares, al igual que en la zona braquial, mesentérica e inguinal entre otras, el





timo se aprecia como una estructura rosada de apariencia glandular en el mediastino pulmonar, el bazo se localiza sobre la curvatura mayor del estomago de forma alargada y de color rojo oscuro, en la porción del yeyuno e íleon se encuentran las placas de Peyer.

En el pez al separar el opérculo izquierdo y debajo de este se puede apreciar el timo de forma ligeramente nodular sobre los arcos de las branquias en su porción craneal, sobre la porción vertebral anterior y a la aorta dorsal se encuentra el riñón de apariencia marrón rojiza, el bazo de forma ligeramente ovoide se localiza en la cercanía del estomago y hepatopáncreas.

Durante el proceso, se extraen los órganos linfoides de cada especie estudiada, para su reconocimiento.

1.5 Resultados

Los linfonodos se reconocen por su íleo, de forma nodular aplanada y de color ligeramente rosado, el bazo de apariencia liza y con capsula de consistencia ligeramente firme, el timo de apariencia lobulada se aprecia mejor en el mamífero y su distribución en rosario en las aves comparten una apariencia glandular, la bolsa de Fabricio de color cremoso en su porción interna muestra su estructura macro con apariencia de gajos. Las placas de Peyer sobre la mucosa son fáciles de reconocer en el conejo, en las aves, las tonsilas cecales se palpan como ligeros nódulos, este tipo de tejido linfoide asociado a la mucosa bajo la lupa se percibe como un ligero abultamiento debido a la edad de las aves. En el pez el riñón es friable y de apariencia ligeramente pulposa.

1.6 Lectura e interpretación

Con ayuda de tijeras se realizan cortes de cada uno y se podrá efectuar el reconocimiento bajo una lámpara con lupa de 15X aproximadamente.

Recomendaciones

Es necesario observar la edad y peso aproximado de las especies requeridas para facilitar la identificación y reconocimiento de los órganos linfoides. Observar los derechos de los animales y los criterios de bioética para un estudio propio de los animales donadores para el aprendizaje.





PRÁCTICA 2: Colección de sangre para obtener suero sanguíneo

2.1 Introducción

El suero es útil para determinar un perfil serológico o bioquímico, por lo que se deben tomar las precauciones necesarias para evitar la contaminación de la muestra y la hemólisis con el objeto de obtener un estudio, resultados y un diagnóstico de calidad.

2.2 Objetivo

Colección de sangre periférica para obtención de suero sanguíneo en la especie animal indicada.

2.3 Material de laboratorio

- Equipo vacutainer con guía tubos de 13x100mm; y de 15x100mm sin anticoagulante.
- Tubos de 12x75mm con anticoagulante heparina o citrato de sodio.
- Frasco con torundas en alcohol al70%.
- Gradilla para tubos.
- Micropipetas de 1000 μ L
- Puntas de plástico para 1000 μ L
- Criotubos estériles de 1.8 mL
- Centrífuga
- Hipoclorito de sodio al 2%

De bioseguridad

- Overol, botas de hule y cuerdas de sujeción.
- Bata de laboratorio, guantes de cirujano y cubreboca

2.4 Técnica

Previa sujeción del animal a obtener la muestra y bajo la recomendación de las normas oficiales de bienestar y trato humanitario a los animales, en los bovinos la muestra de sangre se obtiene de la vena yugular o mejor de la vena caudal previa limpieza de la región perianal. En los equinos de la vena yugular al igual que para ovinos y caprinos.

Para la obtención del suero Se recomienda obtener de 5 a 7 ml. de sangre mediante el uso del sistema vacutainer, en tubo de 13x100 ml sin anticoagulante, con aguja del 18x 22mm. Para la obtención de plasma sanguíneo se recomienda utilizar los tubos con el anticoagulante recomendado en el mismo volumen y en tubos de 12x75mm.

En aves el suero se extrae de la vena radial o por punción cardiaca utilizando jeringa y aguja, de 10 X 22mm.

En los cerdos se obtiene la sangre de la vena marginal de la oreja con jeringa y aguja de 18x22, o de la vena cava anterior con jeringa y aguja de 4x100mm, previa desinfección de la región con torunda y alcohol al 70% además de marcar el curso de la vena.

2.5 Resultados





Suero

Las muestras de sangre completa (sin anticoagulante) serán para colectar el suero sanguíneo y se recomienda enviar la muestra de forma inmediata al laboratorio, a temperatura ambiente, protegida de los rayos solares, sin agitación y en posición vertical.

Si se prefiere, dejar la sangre en reposo, en posición vertical, a temperatura ambiente durante 12 horas, a la sombra y sin movimiento para la formación del coágulo y liberación del suero.

Posteriormente, en el laboratorio, se centrifuga el suero a 2500rpm durante 5-10 minutos para clarificar el suero por la sedimentación de eritrocitos y el coágulo sanguíneo. Se recomienda utilizar guantes de cirujano al trabajar con suero sanguíneo y en determinado momento cubreboca. Bajo condiciones estériles, el suero se distribuye en alícuotas en criotubos de volumen de 1 mL estériles con el uso de punta de plástico o pipeta.

Toda muestra se debe identificar con el fin de evitar errores en el estudio de la muestra del o los animales.

Si se prefiere, las muestras de suero así obtenidas se pueden mantener en congelación a menos 20°C.

Se podrá utilizar una aguja y jeringa por animal según la condición de obtención de la muestra y de la especie animal y posteriormente se obtiene el suero como se describió anteriormente.

Plasma

Esta muestra está indicada para estudios bioquímicos y aquí se hace referencia para comparar la diferencia con el suero sanguíneo. La muestra debe ser obtenida bajo las mismas condiciones de desinfección de la región y en tubos con el anticoagulante apropiado. Inmediatamente a la obtención de sangre, las muestras se mantienen en movimiento de forma suave por unos instantes para homogeneizar la muestra y anticoagulante con el fin de evitar la coagulación parcial o total y se debe remitir inmediatamente al laboratorio para el estudio requerido o se mantiene en refrigeración y sin agitación durante 12 horas como máximo.

Para obtener el plasma es centrifugando la muestra a 1500rpm por 5 minutos con el objeto de sedimentar el paquete celular y finalmente trasvasar a otro tubo estéril y guardar bajo condiciones de refrigeración.

2.6 Lectura e interpretación

En una muestra de sangre extraída de forma apropiada se obtendrá un suero con apariencia transparente y de ligera variación en el color amarillento a pálido, lo cual está relacionado a la dieta y la especie animal.

Las muestras de sangre en agitación o movimiento constante durante su transporte al laboratorio producirán sueros hemolizados que van desde un color rojo débil a fuerte, así mismo, los sueros obtenidos después de varios días de haber muestreado a los animales y sin refrigeración tenderán a contaminarse por lo que los sueros serán de apariencia turbia. Ante estas dos últimas condiciones, los sueros son de mala calidad y conducen a errores en los resultados y en la interpretación del diagnóstico serológico.





PRÁCTICA 3: Obtención de leucocitos mononucleares por concentración en Ficoll-Hypaque a partir de sangre venosa de bovino

3.1 Introducción

En la sangre los leucocitos mononuclear se encuentran constituidos por aquellas células de un solo núcleo dentro de las que se incluye a los linfocitos y los monocitos principalmente. Estas células son importantes en el desarrollo de la respuesta inmune adaptativa de los animales domésticos y de otras especies de vertebrados. Su identificación es importante para evaluar su actividad en estudios de laboratorio para identificar su actividad citotóxica, su transformación blastoide y la producción de citocinas entre otros estudios.

3.2 Objetivo

Separar leucocitos de tipo mononuclear, a partir de sangre venosa de un animal donador para realizar estudios de citología y reconocimiento de las células en el frotis sanguíneo teñido con Giemsa- Wright.

3.3 Material

Biológico y de laboratorio

- Un bovino de talla pequeña en crecimiento
- Suero fetal bovino inactivado a 56°C

Materiales y sustancias

- Jeringas desechables de 20mL con Aguja calibre 18, x 22mm.
- Torundas de algodón en alcohol al 70%.
- Tubos de centrifuga de polipropileno de 15mL.
- Pipeta Pasteur de punta larga con bombillo de goma
- Pipetas de polietileno desechables con bombillo de 5mL.
- Portaobjetos
- Juego de tinción de Giemsa-Wright
- Solución amortiguada de fosfatos pH 7.2
- Solución de Ficoll-Hypaque comercial densidad 1076-1.085
- Solución de azul de tripán 2%
- Solución de Hank con 5 % de suero fetal bovino inactivado a 56°C.

Equipo

- Centrifuga refrigerada de 5000rpm.
- Microscopio óptico

Bioseguridad

- Bata de laboratorio
- Botas de hule

3.4 Técnica





La muestra de sangre se obtendrá del animal donador por la mañana y antes de la práctica. Previa sujeción del animal, se ubicara la vena yugular, se realizara la asepsia y se introducirá una aguja de muestreo para acoplarse al equipo colector para introducir el tubo de muestra conteniendo heparina a 1000UI/mL de sangre obtenida. La sangre se almacena en caja termo de poliuretano con ambiente refrigerado a 4°C y se trasporta al laboratorio. La sangre se deposita en los tubos de plástico en una proporción 1:1 con solución amortiguada de fosfatos PBS en volumen de 10mL para agregar cuidadosamente 5mL de solución de sacarosa y diatrizoato a una densidad de 1.076-1.085 denominada de Ficoll-Hypaque. Se centrifugan las muestras a 1300 rpm o 1000g durante 10 minutos a 4°C. Transcurrido el tiempo se extrae el tubo del rotor procurando no mezclar las capas formadas: la inferior de color rojizo, la intermedia de menor tamaño que contiene las células mononucleares y la superior conteniendo plasma con la solución de fosfatos. Se introduce la pipeta Pasteur de punta larga y se recolecta del fondo de la segunda una capa ligeramente blanquecina que contiene las células bajo estudio, se depositan en otro tubo de centrifuga en la solución amortiguada de fosfatos adicionada con suero fetal inactivado al 5 % para su lavado por centrifugación a 500rpm durante 15 minutos, se decanta el sobrenadante y se repite el procedimiento. Las células se resuspenden en la solución de Hank con suero fetal y se ajusta la concentración a 4×10^6 , en su caso en otro medio apropiado de cultivo celular si se realizan otros procedimientos. Del fondo del tubo se extrae una alícuota con la ayuda de la pipeta Pasteur para ser depositada sobre un portaobjetos y se agrega una gota de azul de tripán al 2%, colocar un cubreobjetos y después de algunos minutos observar al microscopio, para determinar la viabilidad de las células. Las células de color azul se consideran no viables y las claras como viables, finalmente se estima en 20 campos el porcentaje de células viables. En seguida se obtiene otra alícuota del fondo del tubo de muestra, se realiza el frotis y se tiñe con la tinción de Giemsa-Wright.

3.5 Resultados

El porcentaje de células viables será mayor del 90% y la proporción de linfocitos será mayor del 80%.

3.6 Lectura e interpretación

Los linfocitos en el frotis del concentrado de células se reconocen por su forma redonda con un núcleo prominente dentado ligeramente, con una forma arriñonada y citoplasma ligeramente basófilo, de tamaño más grande que un eritrocito. Los monocitos observados en menor proporción tienen un tamaño más grande, núcleo en forma de corbata, citoplasma ligeramente basófilo y vacuolar.

Recomendaciones

Es necesario realizar de manera muy cuidadosa el vaciado de la solución de Ficoll sobre la mezcla de la suspensión de sangre y la solución amortiguadora de fosfatos para evitar que esta se mezcle y afecte la obtención de las células dejando caer lentamente por las paredes del tubo de centrifuga la solución con la ayuda de la pipeta plástica con bombillo.





PRÁCTICA 4: Identificación de linfocitos T de bovino por el fenómeno de roseta con eritrocitos de ovino

4.1 Introducción

Los linfocitos presentes en la sangre representan la mayor proporción de leucocitos del tipo mononuclear dentro de las que se incluyen los monocitos y los plasmocitos. Sin embargo la diferenciación entre los linfocito T y B resulta difícil a nivel de frotis sanguíneo ya que estos comparten características comunes como son un núcleo prominente ligeramente arriñonado, poco citoplasma y tamaño similar, aunque tienen grandes diferencias en su actividad en el sistema inmunocompetente, basta citar la importancia que tiene los linfocito B en la inmunidad humoral y los linfocitos T en la inmunidad celular. Un procedimiento accesible en el laboratorio para diferenciar a los linfocitos T es la formación del fenómeno de roseta al unirse a los receptores θ o antígeno de membrana no dependientes de inmunoglobulina mediante el cual se adhieren eritrocitos de especies distintas al del donador cuando estos se adicionan con una suspensión de eritrocitos al concentrado de linfocitos incubados a 4°C. Los linfocitos de origen humano, bovino, porcino, canino, felino y aviar forman rosetas al ser expuestos con eritrocitos de ovino. De igual forma los de cobayo se adhieren a los del perro, gato, cabra y pollo pero no a los del hombre. Los de rata se unen a los del gato y no a los de perro. En tanto que los del hombre se adhieren a los de perro pero no a los de gato y al caballo.

Bajo esta propiedad la identificación de los linfocitos T se realiza para fines prácticos, sin embargo su identificación más precisa se efectúa mediante técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y detección de anticuerpos monoclonales, separación inmunomagnética y mediante citometría de flujo. Por otra parte la caracterización de los linfocitos B se efectúa mediante las técnicas descritas anteriormente, destacando aquellas que detectan el sitio receptor por la inmunoglobulina de membrana y el C3b del complemento.

4.2 Objetivo

Identificar in vitro linfocitos T mediante la formación de rosetas al exponer linfocitos de bovino con eritrocitos de ovino.

4.3 Material

Biológico y de laboratorio

- Suspensión de linfocitos de bovino obtenida mediante concentración con Ficoll-Hypaque
- Suspensión de eritrocitos lavados de ovino macho al 0.5% en solución de Hank.

Materiales y substancias

- Tubos de centrifuga de polipropileno de 15mL.
- Pipetas Pasteur de polietileno desechables con bombillo
- Portaobjetos
- Juego de tinción de Giemsa-Wright
- Solución amortiguada de fosfatos pH 7.2
- Solución de Ficoll-Hypaque comercial densidad 1.085





- Solución de azul de tripán 0.3%

Equipo

- Centrifuga clínica de 5000rpm.
- Microscopio óptico
- Cámara de Neubauer

Bioseguridad

- Bata de laboratorio
- Guantes de cirujano
- Solución de hipoclorito de sodio al 2 %

4.4 Técnica

Se emplean linfocitos a una concentración de 4×10^6 células/mL en suspensión, contenidos en un tubo de polipropileno o en su caso tubo de vidrio siliconizado y otra suspensión de eritrocitos de ovino macho lavados. En un tubo de polipropileno se depositan 0.25 mL de eritrocitos en suspensión al 0.5% en solución de Hank y suero fetal bovino al 10%, inactivado a 56°C , a la cual se adicionan 0.25ml de la suspensión de linfocitos, se agitan ligeramente y se incuba la muestra a 37°C durante 10 a 15 minutos, centrifugar a 500rpm durante 5 minutos a 4°C . Posteriormente la muestra se incuba a 37°C durante 10 a 15 minutos y se centrifuga a 500rpm por 5 minutos para ser incubada a 4°C durante una noche, al día siguiente se adiciona azul de tripán al 0.3% y se resuspende ligeramente con la pipeta Pasteur, se toma una alícuota y se deposita en la cámara de Neubauer, observar al microscopio con el objetivo 40X para contar 200 linfocitos y estimar la proporción de linfocitos que forman la roseta al mostrar tres o más eritrocitos rodeando al linfocito. Las células teñidas de azul se descartan en el conteo de rosetas.

4.5 Resultados

El porcentaje de linfocitos T se obtiene del total de células viables observadas que formaron rosetas por el determinante antigénico θ .

4.6 Lectura e interpretación

Los linfocitos que se adhieren a los eritrocitos son considerados linfocitos T, las células teñidas de azul no se consideran al ser inviables.

Recomendaciones

La suspensión de linfocitos debe de ser fresca menor a las 24 horas al igual que la de eritrocitos. El procedimiento puede ser empleado para identificar linfocitos T en otras especies señaladas en el texto. Los materiales empleados se sumergirán en la solución de hipoclorito de sodio durante un mínimo de treinta minutos.





PRÁCTICA 5: Inmunización de un conejo con antígeno inactivado de *Bordetella bronchiseptica*

5.1 Introducción

El desarrollo de la respuesta inmune humoral tiene como consecuencia la producción de anticuerpos como respuesta del organismo a un antígeno inactivado, ya sea por métodos físicos o químicos para elaborar cierto tipo de vacunas. Los antígenos no inactivados se denominan antígenos activos modificados ya que han sido modificados en su virulencia y patogenicidad mediante procedimientos de laboratorio, pero conservan su viabilidad para multiplicarse al ser aplicados como vacunas en los animales.

El desarrollo de la respuesta inmune se caracteriza por dos fases: una respuesta o fase primaria y una respuesta secundaria o de memoria. El modelo de laboratorio desarrollado en conejo donador y ante el tipo de antígeno utilizado en esta práctica pretende ilustrar el desarrollo de estas fases y la posterior determinación de los niveles séricos de anticuerpos en los diferentes días durante el período de observación experimental.

5.2 Objetivo

Determinar el nivel de anticuerpos ante *B. bronchiseptica* a los 0, 14, 28 y 42 días.

5.3 Material

Biológico

- Un conejo macho adulto de la raza Nueva Zelanda
- Antígeno inactivado de *B. bronchiseptica* con 10^{-8} mL. Vacuna comercial

Médico clínico

- Jeringas desechables de 3.0 mL., con agujas calibre 22 y 24 pulgadas.
- Torundas de algodón en alcohol al 70 %
- Tubos estériles sin anticoagulante

De campo

- Alimento comercial para conejos en etapa adulta
- Jaulas metálicas
- Implemento para la sujeción cervical de conejos integrado a una base móvil.

Bioseguridad

- Cubrebocas
- Bata de laboratorio
- Guantes para cirujano
- Botas de hule
- Contenedor para objetos punzo cortantes
- Bolsa para residuos biológicos no infecciosos

De laboratorio





- Refrigerador
- Congelador -20°C
- Centrifuga clínica a 5000 rpm
- Aglutinoscopio
- Termómetro de 0 a 100°C
- Micropipeta de 20 a 50µl
- Solución salina fosfatada pH 7.4
- Criotubos de 1.8 mL.

5.4 Técnica

Manejar al conejo y colocarlo en posición decúbito dorsal para exponer la parte ventral hacia arriba, desinfectar con torunda de algodón con alcohol al 70% la región de la punta del apófisis xifoides.

1. Con jeringa del 5.0 mL y con ajuga del número 16, dirigiéndola hacia adelante, ligeramente hacia la derecha y en un ángulo de 45° extraer aproximadamente 5.0 mL de sangre por punción intracardiaca y colocar la muestra en tubo estéril y dejar que coagule para centrifugar la muestra de sangre a 2500 rpm durante 10 minutos y obtener posteriormente el suero bajo condiciones de esterilidad en criotubo estéril.
2. Previa desinfección con alcohol, aplicar por vía intramuscular 0.5 mL de antígeno inactivado los días 0 y 14. Si la respuesta inmune es débil, se recomienda inocular al animal los días 28 y 4.
3. En tubos vacutainer, obtener 5 mL de sangre el día 14, 28 y 42 y procesar el suero como se mencionó arriba para obtener el suero y distribuirlo en alícuotas en criotubos estériles con la identificación de la fecha correspondiente.
4. Congelar las muestras a -20°C.
5. Mediante una prueba de aglutinación en placa de vidrio cuadrículada depositar 20 µl de la solución salina fosfatada y 20 µl del suero problema.
6. Homogeniza la suspensión con palillo de madera.
7. Alternamente, realizan diluciones dobles seriadas del suero en PBS y agregar 10 µl del antígeno de *B. bronchiseptica*.
8. Homogeneizar la suspensión y dejar reposar durante dos minutos para observar la aglutinación.

5.5 Resultados

La dilución que muestre la aglutinación se expresa como el título recíproco de la dilución mayor.

5.6 Lectura e interpretación

Observar la presencia de aglutinación que puede presentarse de leve a intensa expresada como 1+, 2+, 3+ y 4+ en los primeros dos a tres minutos, dependiendo de la respuesta inmune del animal, por otra parte, esta puede desaparecer en la forma alterna de dilución del suero en la dilución mayor debido a una respuesta intensa manifestándose el fenómeno de zona.

Recomendaciones





Realizar la prueba de aglutinación a una temperatura no mayor de 20 a 22 °C.





PRÁCTICA 6: Evaluación de la inmunidad pasiva en el neonato

6.1 Introducción

En el ternero la transferencia de inmunoglobulinas a través del calostro y su absorción intestinal se ve favorecida e incrementada por la permeabilidad intestino durante las primeras horas de vida. En el bovino y especies relacionadas, debido a la nula transferencia de inmunoglobulinas a través de la placenta, el ternero nace agamaglobulinémico, pero una vez que este ingiere calostro las inmunoglobulinas se absorben inmediatamente y se detectan dentro de las primeras 72 horas. Los terneros que no ingieren el calostro se consideran agamaglobulinémicos y los que recibieron una baja dosis de calostro se consideran hipogamaglobulinémicos, bajo esta condición los animales se encuentran ante un riesgo de adquirir infecciones neonatales que pueden comprometer la vida del recién nacido a diferencia de los animales que recibieron cantidades adecuadas de calostro al nacimiento. La adición de sulfato de zinc en una muestra de suero resulta en una suspensión turbia del suero, debido a las globulinas precipitadas y suspendidas en el mismo. La turbidez es proporcional a la cantidad en miligramos de inmunoglobulina utilizando controles estándar conocidos para compararlos con los del animal.

6.2 Objetivo

Evaluar cualitativamente el nivel de inmunoglobulinas en los terneros recién nacidos.

6.3 Material

Biológico

- Muestras de suero sanguíneo de terneros recién nacidos sin ingestión de calostro
- Muestras de suero sanguíneo de terneros 24 horas post amamantamiento
- Muestras de suero sanguíneo de terneros destetados

Médico clínico

- Equipo vacutainer (tubo y aguja)
- Torundas en alcohol al 70%
- Gradilla para tubos

De campo

- Caja de poliuretano con refrigerantes a 4°C

Bioseguridad

- Cubrebocas
- Bata de laboratorio
- Guantes de cirujano
- Botas de hule
- Bolsas de plástico para material biológico no infeccioso
- Recipiente de objetos punzo cortantes

De laboratorio

- Centrifuga clínica a 5000 rpm





- Micropipetas de 10 a 200 μ L
- Criotubos de 1.8 mL.
- Congelador a -20°C
- Sulfato de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) en solución acuosa 208 mg/L
- Inmunoglobulina sérica (fracción globulínica) estándar comercial.
- Suero control negativo becerro sin ingestión de calostro.
- Suero control positivo becerro con ingestión de calostro de 24 horas.

La sujeción y manejo de los animales se realizara en consideración a los criterios de la bioética y a lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999.

6.4 Método

1. Obtener de los terneros muestras de sangre de la vena yugular con el equipo vacutainer la cantidad de 7.0 mL aproximadamente.
2. Colocar los tubos en gradilla en la caja.
3. Horas después, centrifugar los tubos con a 2500rpm durante 10 minutos.
4. Recolectar el suero clarificado y en alícuotas depositarlo en criotubos.
5. Identificar los tubos con suero y congelar las muestras a -20°C hasta el momento de realizar la prueba.
6. Al momento de la prueba, retirar los sueros del congelador y dejarlos a temperatura ambiente durante una hora.
7. Preparar 7 tubos con 6.0 mL de una solución de sulfato de zinc: 208 mg/L.
8. Estos tubos como control y a esta serie de tubos se les adicionan proporcionalmente 100 μ L de albúmina sérica bovina como diluyente en suspensión a concentraciones g/L de; 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12.
9. Utilizando un tubo como prueba de cada muestra de los animales, se agrega solamente sulfato de zinc en solución y posteriormente se les agregara 100 μ L del suero problema. Los tubos se homogenizan manualmente con movimientos en abanico durante tres minutos y se reposan durante dos minutos.

6.5 Resultados

Establecer la concentración cualitativa de inmunoglobulinas en el valor de prueba de los terneros:

1. Sin calostrar recién nacido
(Valor normal 0g/L)
2. Calostrado de 24 horas
(Valor normal entre 4 y 6 g/L)
3. Al destete
(valor normal cercano a 4 g/L)

6.6 Lectura e interpretación

Los tubos control negativo (0) se compararán con los tubos con las diferentes concentraciones de la albúmina para establecer cualitativamente la concentración sérica de inmunoglobulinas de las





muestras problema. Al agregar la solución de sulfato de zinc a la suspensión de albúmina este debe quedar transparente debido a que no se precipita en presencia del sulfato de zinc y esta funciona como control negativo de la prueba. Al observar tubos con suspensión turbia de los becerros de prueba este indica que contienen inmunoglobulinas séricas. Estos tubos se comparan con el siguiente criterio para emitir el resultado.

Recomendaciones

Evitar la hemólisis del suero durante su obtención. Prepara una solución fresca de sulfato de zinc y conservar en refrigeración la solución. Los tubos de control prueba se preparan 24 horas antes. Las diferentes concentraciones de albumina sérica se adicionan una hora antes de efectuar la prueba cualitativa. Los tubos de prueba de los sueros problema se preparan al momento. Es importante observar los tiempos de descongelado de los sueros congelados. Evitar descongelar y volver a congela las muestras para evitar que disminuya la concentración cualitativa de inmunoglobulinas durante las pruebas posteriores. En las muestras de suero recién obtenidas no es necesario observar esta recomendación.





PRÁCTICA 7: Pruebas de aglutinación

7.1 Introducción

La prueba de Tarjeta o Card Test, se utiliza para identificar la reacción antígeno anticuerpo específica como resultado de la respuesta inmune de los animales. En la práctica, se utiliza para detectar anticuerpos en algunas enfermedades de los animales como la infección producida por *Brucella abortus*. La brucelosis es una enfermedad que afecta a la ganadería del país, produce grandes pérdidas económicas además, se convierte en un importante problema en salud pública como zoonosis, la enfermedad afecta principalmente al sistema reproductor de los animales afectados, origina abortos, esterilidad temporal o permanente, interrupción en el mejoramiento genético de los animales entre otros factores.

Para su control existen pruebas de diagnóstico de laboratorio que son interpretadas en base al tipo de prueba que de forma práctica se utilizan para los programas de control y erradicación de la infección.

En base a la estructura e isotipo de la molécula del anticuerpo, existen sustancias que reducen su propiedad al reaccionar con algunas sustancias reductoras como es el rivanol, sustancia que al actuar muestra las características de la clase de anticuerpo detectada en el suero sanguíneo.

La prueba de anillo en leche detecta la presencia de anticuerpos IgA, IgG e IgM en leche normal de bovinos, leche entera queso crema u otro subproducto lácteo. Las muestras se recolectarán 24 horas antes de la realización de la prueba las cuáles serán refrigeradas por no más de 3 días.

7.2 Objetivo

Detectar anticuerpos contra *B. abortus* en suero sanguíneo.

7.3 Material de laboratorio

- Placa de vidrio
- Aglutinoscopio
- Centrífuga clínica 5,000 rpm
- Micropipeta de 5, 10-50 y de 200 a 1000 μ l
- Puntas de plástico de 5, 10-200 y 1000 μ l
- Palillos o removedores
- Reloj marcador
- Guantes para cirujano
- Tubos de ensaye de 13x100mm

Reactivos de laboratorio

- Suero sanguíneo de animales vacunados contra la brucelosis
- Suero sanguíneo de animales no vacunados
- Antígeno *Br. abortus* para prueba de tarjeta al 8%
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Solución hipoclorito de sodio 2%
- Detergente
- Bolsas de polipapel
- Antígeno de *Br. abortus* para prueba de rivanol
- Solución de rivanol





Prueba de Tarjeta

7.4 Técnica

1. Mezclar el antígeno y colocar 30 μ L de antígeno en cada cuadro de la placa de vidrio.
2. Depositar 30 μ L de suero problema al lado del antígeno que se encuentra en los cuadros.
3. Utilizando un palillo para cada suero, mezclar el suero y el antígeno con movimiento de rotación.
4. Aplicar a la placa movimiento rotación y en vaivén durante 4 minutos.
5. Realizar la lectura a través de un aglutinoscopio.

7.5 Resultados

La mezcla de reactivos permanece homogénea o ausencia de grumos, de lo contrario la mezcla muestra la presencia de grumos.

7.6 Lectura e interpretación

Reacción negativa: Se observa un color rosa uniforme y ausencia de grumos.

Reacción positiva: Se observa una aglutinación desde ligera a gruesa. Todos los sueros positivos serán destinados a la siguiente prueba confirmatoria.

Prueba de Rivanol

7.4 Técnica

Colocar los tubos en gradilla, identificar los tubos de 13x100mm y depositar en cada tubo 200 μ L de solución de rivanol, por cada tubo con solución agregar el suero problema, agitar los tubos durante 20 segundos y dejar incubar a temperatura de laboratorio por 15 a 20 minutos. Centrifugar los tubos a 1500 rpm por 5 minutos. Retirar los tubos de la centrifuga y del sobrenadante, por tubo depositar las cantidades de 80, 40, 20, 10 y 5 μ L en cada cuadro de una placa de vidrio cuadrada, agregar 30 μ L de antígeno de rivanol en cada cantidad de suero depositado. Mezclar la muestra suero antígeno con palillo de madera (uno por cada suero) iniciando con la cantidad de suero más pequeña. Aplicar a la placa de vidrio un movimiento de rotación por 15 segundos e incubar por 6 minutos a temperatura de laboratorio, agitar nuevamente los tubos e incubar otros seis minutos.

7.5 Resultados

La mezcla de reactivos permanece homogénea o ausencia de grumos, de lo contrario la mezcla muestra la presencia de grumos.

7.6 Lectura e interpretación

Reacción negativa: la mezcla suero y antígeno es de aspecto homogéneo.

Reacción positiva. Se observa la formación de grumos.





Nota: La presentación de grumos en cualquier dilución del suero se considera una muestra positiva. Además se debe consultar la bibliografía en caso de que existan animales vacunados y no vacunados en un hato contra la brucelosis bovina.

Prueba de anillo en leche

Materiales

- Incubadora ó Baño María a 37°C
- Leche entera de bovino
- Gradilla para tubos
- Antígeno de *B. abortus* 4%
- Tubos de vidrio de 13x100 mm
- Solución hipoclorito de sodio 2%
- Refrigerador
- Micropipetas de 5-50 y 200-1000 μ L
- Puntas de plástico de 10-50 y de 200 a 1000 μ L
- Reloj marcador
- Plumón

7.3 Técnica

1. La leche y el antígeno deberá estar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
2. Utilizar e identificar dos tubos por muestra de leche a ser analizada.
3. Depositar 1.0 mL de leche en cada tubo.
4. Agregar 30 μ L de antígeno a cada tubo.
5. Mezclar los reactivos tapando el tubo con parafilm y con el dedo índice aplicar movimiento en abanico.
6. Incubar los tubos a 37°C durante 1 hora en baño maría o en incubadora bacteriológica.

7.4 Resultados

Dos tipos de reacciones: La primera reacción es cuando la columna de leche se observa homogéneamente coloreada. Y en la segunda reacción la columna de leche es de color claro y se forma en la superficie un anillo de color azul.

7.5 Lectura e interpretación

Reacción negativa: La columna de leche se observa homogéneamente coloreada.
Una reacción positiva se observa la presencia de un anillo de color azul a morado en la parte superior de la leche.

Los resultados de esta prueba conducirán al muestreo individual de los animales para realizar las pruebas serológicas.

Precauciones





Los sueros y el antígeno deberán estar 30 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la prueba y no deberán estar hemolizados ni contaminados.
No debe aplicarse la prueba en calostro, leche con mastitis, leche de caprinos, leche homogeneizada y el resultado positivo deberá confirmarse con pruebas serológicas.





PRÁCTICA 8: Evaluación de la reacción de hipersensibilidad IV

8.1 Introducción

Cuando los animales han sido sensibilizados previamente contra determinados antígenos y posteriormente se les inyecta en la piel el antígeno, algunos de los animales pueden presentarse una respuesta inflamatoria en el sitio de aplicación que va en aumento conforme transcurren las horas, a este tipo de respuesta se le conoce como hipersensibilidad tipo IV, tardía o mediada por células. Cuando la tuberculina bovina o PPD bovino, se inyecta por vía intradérmica a animales no sensibilizados o normales no se observa respuesta inflamatoria local importante, pero si se inyecta a animales sensibilizados por la infección con el bacilo de la tuberculosis bovina se producirá una respuesta de hipersensibilidad tardía. Esta prueba en los animales bovinos se utiliza para detectar animales positivos a la tuberculosis que estuvieron en contacto con el bacilo del *M. bovis*, se realiza en hatos de bovinos a partir de los seis meses de edad y se practica en la región caudal y en la región cervical. El protocolo descrito se refiere de la Norma Oficial Mexicana NOM-031-ZOO-1995 Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina.

8.2 Objetivo

Detectar animales positivos a la tuberculosis mediante esta prueba.

8.3 Materiales

- Overol
- Botas de hule
- Cuerdas de sujeción
- Jeringas graduada de 1.0 mL estériles con aguja calibre 24 a 26" y de 1cm de longitud.
- Caja de poliuretano con refrigerantes
- Libro de anotaciones
- Reactivo PPD bovino
- Reactivo PPD aviar
- Unidad de producción de bovinos productores de leche o de carne, en la Posta Zootecnica de la Facultad de MVZ. Alternativamente en aproximadamente 5 km en el entorno de la Facultad: Municipios de Taborda o en Sta Juana.
- Placebo: (solución de ácido tricloroacético 5%) como control didáctico positivo.

8.4 Técnica

Seguir cuidadosamente las instrucciones del conductor de la práctica en cada una de las pruebas para interpretar los resultados.

Prueba Caudal

1. Bajo las normas de manejo y bienestar animal, inmovilizar al animal.
2. Limpiar la zona del pliegue ano caudal en donde se aplicará el biológico.
3. Insertar la aguja en toda su longitud vía intradérmica en un ángulo de 45° e inyectar 0.1 mL de tuberculina. Deberá aparecer un pequeño abultamiento en el sitio de la aplicación.





4. Reacción placebo: siguiendo el mismo procedimiento se aplicará 0.1mL de la solución de ácido tricloroacético para producir una reacción inflamatoria similar a la de la tuberculina con fines didácticos de interpretación de la reacción positiva.

8.5 Resultados

72 horas post inoculación, (más o menos 6 horas) observar y palpar cuidadosamente el sitio de la aplicación.

8.6 Lectura e interpretación

Reacción Negativa: Cuando no se observa y a la palpación ningún cambio en la piel del sitio de inoculación.

Reacción positiva Cuando es visible y a la palpación existe cualquier engrosamiento: rubor, calor dolor o necrosis del tejido en el sitio de inoculación, se considera como animal reactor a la prueba.

Prueba cervical comparativa

8.2 Objetivo

Confirmar o descartar animales reactores a la prueba caudal.

8.4 Técnica

1. Rasurar el tercio medio superior del cuello siguiendo las siguientes instrucciones:
2. El primer sitio de inoculación o superior es 10 cm debajo de la cresta del cuello.
3. El segundo sitio de inoculación o inferior es 13 cm debajo del anterior.
4. Levantar un pliegue de piel del centro de las áreas rasuradas y medir el grosor de estos mediante un cutímetro vernier o pie de ángel.
5. Los valores del grosor de la piel obtenidos se deben redondear bajo el siguiente criterio: 6.2 baja a 6.0 cm; 6.3 sube a 6.5 cm; 6.7 baja a 6.5 y de 6.8 sube a 7.0 y se registran los valores en el cuaderno de anotaciones.
6. Utilizando jeringas diferentes, inocular por vía intradérmica 0.1 mL de PPD aviar en el sitio superior.
7. De la misma manera, inocular 0.1 mL de PPD bovino en el sitio inferior.

8.5 Resultados

Realizar la lectura de la prueba a las 72 horas post inoculación (más o menos 6 horas) y detectar la presencia o ausencia de signos de inflamación y dolor en el sitio de inoculación.

8.6 Lectura e interpretación

1. Cuidadosamente observar y, medir con el cutímetro el grosor de piel para interpretar las reacciones y anotar los resultados.
2. Sustraer el valor de la primera lectura de la segunda.





3. Graficar los valores obtenidos del PPD aviar y del PPD bovino y el punto de intersección dará el resultado de la prueba.
4. De acuerdo a la gráfica se interpretaran los resultados.

Recomendaciones

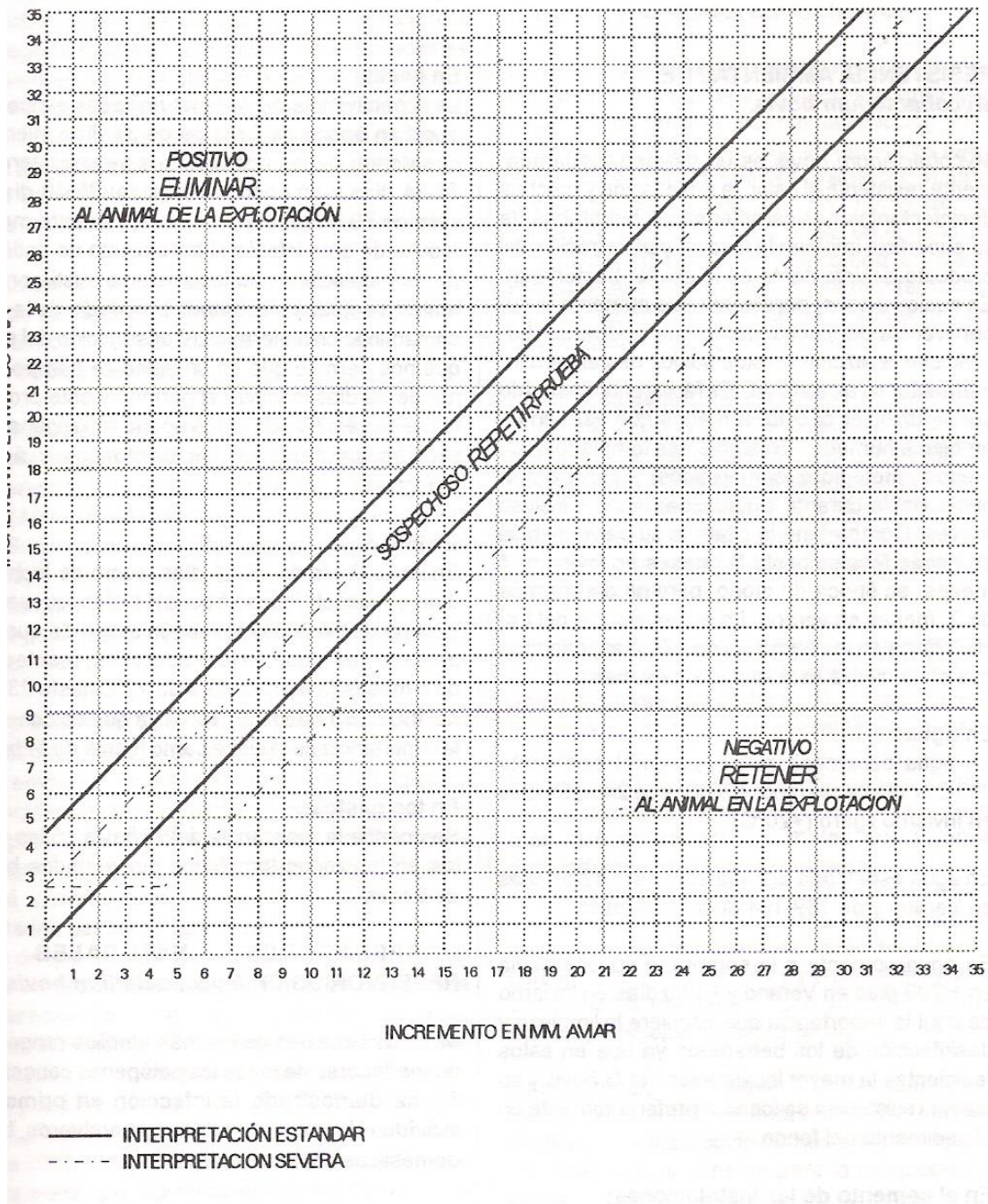
La prueba siempre debe realizarse por un MVZ., así como para realizar la lectura.

La prueba se debe efectuar dentro de 10 días posteriores a la prueba caudal y por una sola vez, o transcurridos 60 días.





INTERPRETACION DE LA PRUEBA CERVICAL COMPARATIVA





PRÁCTICA 9: Prueba de hemoaglutinación Ha, e inhibición de la hemoaglutinación HI

9.1 Introducción

En un sistema biológico, existen antígenos que poseen la propiedad de aglutinar glóbulos rojos de determinada especie en concentración conocida, por lo tanto sirve para detectar animales que han estado en contacto con determinados antígenos y para detectar anticuerpos específicos a éstos.

9.2 Objetivo

Determinación del título del virus hemoaglutinante.

9.3 Materiales

- Microplacas con fondo en U o en V.
- Virus de la Enfermedad del Newcastle
- Multipipeta de 12 canales de 25 a 50 μ l
- Suero de animales
- Micropipeta de 200-1000 μ l
- Diluyente PBS pH 6.8-7.0
- Centrífuga clínica hasta 5000 rpm
- Suspensión de eritrocitos de pollo al 1%.
- Refrigerador 2-8°C.
- Solución hipoclorito de sodio 2%.
- Congelador de menos 20°C
- Pollos de 1 mes de edad
- Puntas de plástico de 5 a 200 μ l
- Puntas de plástico de 200 a 1000 μ l
- Frascos o vasos de precipitado para diluyente estéril.
- Recipiente para la solución desinfectante.
- Jeringas de 5.0 y 10 ml con aguja de número 20.

9.4 Técnica

Estandarización y determinación de las unidades hemoaglutinantes UH del virus.
Colocar la microplaca en un material fijo para evitar movimiento.

1. Depositar 100 μ L de solución buferada (PBS) en el primer pozo de la fila A y 50 μ L hasta el pozo número cinco. Descartar las puntas en el desinfectante.
2. Adicionar 25 μ L de antígeno en el primer pozo, mezclar bien y descartar 25 μ L y la punta.
3. La dilución en este pozo representa 1:5. (volumen final es de 100 μ L).
4. Con micropipeta y punta, mezclar y pasar 50 μ L del primer pozo al segundo, al tercero y así sucesivamente hasta llegar al quinto pozo donde se descartan 50 μ L restantes. En ésta forma se tienen las diluciones 1:5, 1:10, 1:20, 1:40 y 1:80.
5. Agregar a todos los pozos 50 μ L de glóbulos rojos de ave a la concentración deseada (0.5% - 0.75%).





6. Incluir un control de glóbulos rojos en el pozo numero seis agregando 50 μ L de PBS y 50 μ L de glóbulos rojos.
7. Incubar durante 45 a 60 minutos a temperatura ambiente. Estar pendiente si el control de glóbulos rojos ya ha formado botón ya que éste es el mejor indicador para leer la prueba.
9. Leer la prueba al término del período de incubación. El título hemoaglutinante del “antígeno” es la dilución más alta donde existe completa hemoaglutinación y es una unidad HE. Determinar 10 UH para la prueba de HI.

9.5 Resultados

Presencia o ausencia de aglutinación en cualquiera de las diluciones.

9.6 Lectura e interpretación

- + = completa aglutinación
- + - = trazas de células aglutinadas rodeando un botón de células no aglutinadas.
- O = no aglutinación.

Prueba de inhibición de la hemoaglutinación HI

9.2 Objetivo

Determinación del título de anticuerpos contra el virus de la enfermedad del Newcastle.

9.3 Materiales

- Microplacas con fondo en U o en V.
- Antígeno del VEN
- Multipipeta de 12 canales de 25 a 50 μ L
- Suero de animales
- Micropipeta de 200-1000 μ L
- Diluyente PBS pH 6.8-7.0
- Centrifuga clínica hasta 5000 rpm
- Suspensión de eritrocitos de ganso al 1%. Refrigerador 2-8°C.
- Solución hipoclorito de sodio 2%.
- Congelador de menos 20°C
- Pollos de 1 mes de edad
- Puntas de plástico de 5 a 200 μ L
- Puntas de plástico de 200 a 1000 μ L
- Frascos o vasos de precipitado para diluyente estéril.
- Recipiente para la solución desinfectante.
- Jeringas de 5.0 y 10 ml con aguja de numero 20.

9.4 Técnica

1. Adicionar 100 μ L de antígeno de 10 U en el primer pozo y 50 μ L en los demás pozos.
2. Con micropipeta, depositar 25 μ L el suero problema en el primer pozo, se mezcla bien y se





descartan 25 μ L.

3. Con micropipeta, pasar 50 μ L del primer pozo al segundo y 50 μ L del segundo al tercero y así sucesivamente hasta la última cavidad. Las diluciones así se duplican, iniciando con 1:5, siguiendo 1:10 etc.
4. Incubar la prueba a temperatura ambiente como mínimo 30 minutos.
5. Post-incubación, agregar 50 μ L de glóbulos rojos de ave a la concentración necesaria.
6. Mezclar bien agitando suavemente la microplaca.
7. Incubar a temperatura ambiente la microplaca aproximadamente 45 minutos.
8. La lectura de los resultados se realizan al final del periodo de incubación

9.5 Resultados

Presencia o ausencia de aglutinación en cualquier dilución.

9.6 Lectura e interpretación

- + = completa aglutinación
- + - = trazas de células aglutinadas rodeando un botón de células no aglutinadas.
- O - = no aglutinación.

El título final de un suero es la reciproca de la dilución más alta donde se haya inhibido la hemoaglutinación.

Recomendaciones

Es importante incluir sueros controles positivos y negativos que sirven de referencia.
El control de glóbulos rojos es indispensable.

Control de antígeno: Este control debe prepararse inmediatamente después de haber incubado los sueros más el antígeno y antes de la segunda incubación final de la prueba, bajo el siguiente esquema:

1. Depositar en el primer pozo 100 μ L de antígeno de 10 unidades. En los demás pozos adicionar 50 μ L de PBS.
2. A partir del primer pozo, pasar 50 μ L al segundo, al tercero, etc.
3. Agregar 50 μ L de glóbulos rojos diluidos a la concentración necesaria. (Paso simultáneo a la adición general de los glóbulos rojos en toda la prueba).

En este proceso se diluye el antígeno: en el primer pozo quedan 10U, en el segundo 5U, en el tercero 2.5, en el cuarto 1.125 y en el quinto 0.625. Por lo tanto si el antígeno quedo bien diluido el botón debe estar bien formado en el pozo donde hay menos de una unidad (quinto pozo donde hay 0.625 unidades) y un poco borroso, pero aún aglutinado en la cavidad donde existe un poco más de una unidad o sea en el cuarto pozo.

Este control es muy importante en la realización de la prueba de Ha y HI ya que la cantidad del antígeno determina la cantidad y sensibilidad de la prueba y por lo tanto es el reactivo más crítico en la prueba.





Interpretación de los títulos de anticuerpos

El título de anticuerpos inhibidores de la hemoaglutinación se define como la dilución más alta que inhibe la aglutinación de eritrocitos.

Su interpretación se puede hacer por su media geométrica o título medio geométrico.

III. BIBLIOGRAFIA

- Normas Oficiales Mexicanas en Salud Animal:
- NOM-031-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Tuberculosis Bovina.
- NOM-041-ZOO-1995. Campaña Nacional contra la Brucelosis en los animales.
- NOM-013-ZOO-1994. Campaña Nacional contra la enfermedad de Newcastle.
- NOM-033-ZOO-1995. Sacrificio humanitario de los animales domésticos y silvestres.
- NOM-062-ZOO-1995. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.
- NOM-063-ZOO-2000. Especificaciones para los biológicos empleados en la prevención y control de las enfermedades que afectan a los animales.
- DERECHOS DE LOS ANIMALES, WHO.
- CÓDIGO DE BIOÉTICA.
- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: 2007. Inmunología de Kuby. Ed. McGraw-Hill. México. Sexta edición. ISBN 13: 978-970-10-6454-2
- Knipe D. M.; Howley P. M. N. 2001. Fundamental Virology. Fourth Edition. Lippincott Williams and Wilkins
- Shuneman Aluja, A. 1986. Procedimiento de necropsia del ave y del conejo.
- Tizard, I.R.: 2004. Veterinary immunology, an introduction. Saunders, Elsevier, USA. Sevent edition. ISBN 0-7216-0136-7





IV. ANEXOS

Guía de preparación de reactivos y soluciones

Solución salina fosfatada buferada PBS

Fosfato de sodio dibásico	1.6 g
Fosfato monopotásico	0.510 g
Cloruro de sodio	7.300 g
Agua destilada	1000 ml
pH	7.1- 7.3

Filtrar a través de papel filtro

Esterilizar por autoclave a 121 °C durante 30 minutos

Guardar a temperatura ambiente

ALSEVER

Glucosa	2.05 g
Citratotrisódico	0.8 g
Acido cítrico	0.05 g
Cloruro de sodio	7.300 g
Agua destilada	100 ml
pH	6.1

Esterilizar por filtración de 22 µm o a 110 °C durante 20 minutos

Guardar a 4° C y usarlo en proporción 1:1.

TRIPAN AZUL AL 1%

Tripan azul	1g
PBS estéril	100 ml

Disolver.

Guardar a temperatura ambiente.

ALCOHOL

Etanol	70 ml
Agua destilada	30 ml

Mezclar y colocar torundas de algodón. Guardar en un frasco de boca ancha.

HIPOCLORITO DE SODIO AL 2% NaClO (Desinfectante)

Hipoclorito de sodio (cloralex)	2 ml
Agua corriente	98 ml

Guardar a temperatura ambiente

LABORATORIOS PRONABIVE

Antígeno *B. abortus* prueba de tarjeta al 8%

Reactivos: Antígeno *B. abortus* y Solución para Prueba de rivanol al 12%





V. ACTUALIZACIÓN

Manual de Prácticas de Laboratorio de Inmunología. Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma del Estado de México. Toluca, México; 25 de febrero de 2013.

Primera Edición

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECCIA

Director:

Dr. en C. José Mauro Victoria Mora

Elaboró:

M en C. Lemuel León Lara
Dr. Valente Velázquez Ordóñez

Revisó:

M en C. Pomoposo Fernández Rosas
Dr. Alejandro Quijano Hernández

