



PROGRAMA DE PRÁCTICAS DE INMUNOLOGÍA

I. IDENTIFICACIÓN DEL CURSO

ORGANISMO ACADÉMICO: Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia								
Programa Educativo: Médico Veterinario Zootecnista				Área de docencia: Salud Animal				
Aprobación por los H.H. Consejos Académico y de Gobierno		Fecha: 17/07/2013		Programa elaborado por: Dra. Ma. Uxúa Alonso Fresán M. en C. Valente Velázquez Ordoñez M. en C. Pomposo Fernández Rosas Q.F.B. Héctor Roberto Díaz Guadarrama Revisado por: M en C. Lemuel León Lara Dr. Valente Velázquez Ordóñez			Fecha de elaboración : 17/03/06 Fecha de revisión: 19/06/2013	
Clave	Horas de teoría	Horas de práctica	Total de horas	Créditos	Tipo de Unidad de Aprendizaje	Carácter de la Unidad de Aprendizaje	Núcleo de formación	
L43729	4	2	6	10	Curso	Obligatoria	Sustantivo	
Prerrequisitos (Conocimientos Previos): Fisiología, Anatomía, Histología y Embriología		Unidad de Aprendizaje Antecedente Ninguna			Unidad de Aprendizaje Consecuente Ninguna			
Programas educativos en los que se imparte: Medicina Veterinaria y Zootecnia								



PRACTICA No. 1

RECONOCIMIENTO DE ORGANOS LIFOIDES EN LOS ANIMALES VERTEBRADOS

INTRODUCCIÓN

El sistema inmune integra los órganos y células que participan en la inmunidad adaptativa a través de los órganos linfoides; primarios generadores de las células linfoides (timo, bolsa de fabricio y bazo), y secundarios en su función periférica albergan a las células presentadoras de antígenos y linfocitos(linfonodos, tonsilas, placas de peyer y acumulos linfoides en la mucosa), los cuales son requeridos para suministrar las células necesarias para montar la respuesta inmune al establecer contacto con los diferentes antígenos que circulan en el torrente sanguíneo y la linfa en los que participación los linfocitos B y T. Por otra parte las células linfoides presentes en mucosa gastrointestinal (GALT), bronquial (BALT) y mucosas (MALT) interaccionan con las células presentadoras de antígeno en el desarrollo de la inmunidad en el hospedador.

OBJETIVO

Identificar y reconocer los órganos linfoides primarios y secundarios en los mamíferos, las aves y los peces al efectuar la disección de los vertebrados en estudio.

MATERIAL

- Biológico
 - Un conejo de destete entre 4 y 5 semanas de edad
 - Un pollo de engorda entre 2 y 3 semanas de edad
 - Una trucha arcoíris de aproximadamente 250 g de peso vivo
 - Fármacos para la eutanasia
 - Acepromacina (AC) solución 0.5% frasco de 10mL.
 - Xilacina (XC) solución al 2% frasco de 10mL.
 - Pentobarbital sódico (PB) en solución al 6.2% frasco de 50mL.
 - Tabletas de ácido acetil salicílico (AO) 500 mg en base de ácido cítrico y bicarbonato de sodio
 - Médico quirúrgico
- Jeringa desechable de 3mL., con aguja calibre 22
- Jeringa hipodérmica desechable de 3mL., con aguja calibre 24
- Compresa de gasa de algodón
- Estuche de disección



- Bioseguridad
 - Cubrebocas
 - Bata de laboratorio
 - Guantes de látex de cirujano
 - Botas de hule

CONDICIONES DE LA PRACTICA

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.

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 22. Otra forma alterna es, sujetar al ave en posición decúbito ventral con alas abiertas para inyectar por vía intracardiaca, con el dedo índice localizar el fondo de la cavidad torácica para dirigir la jeringa con aguja calibre 18, 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 reconocimiento de los órganos linfoides.

Conejo: Su manejo se realiza con el apoyo de un compañero, sujetar al animal con la mano izquierda por la piel del cuello y colocarlo en un cajón sujetador a manera que un gancho pase por arriba y atrás del cuello del animal y administrar intramuscularmente la solución AC a una dosis de 0.05mg/Kg., utilizando jeringa y aguja calibre 22. Al producirse la sedación del animal, posteriormente se desinfecta una de las orejas con 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 24. 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 totalmente flácido. De manera alternativa se



puede utilizar 1mL., 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.

Procedimiento

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 púrpura, 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 linfonodos submandibulares, 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 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 ventralmente 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.

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.

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 fáciles de reconocer en el conejo, que en las aves, las tonsilas cecales solo se



palpan como ligeros nódulos y bajo la lupa se perciben como un ligero abultamiento, debido a la edad de las aves, en el pez el riñón es friable y de apariencia ligeramente pulposa.

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 No. 2

COLECCIÓN DE SANGRE PARA OBTENER SUERO SANGUÍNEO

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.

Objetivo

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

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

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 cardíaca 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.

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.

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 No. 3

OBTENCIÓN DE LEUCOCITOS MONOCUCLEARES POR CONCENTRACIÓN EN FICCOL HIPAQUE A PARTIR DE SANGRE VENOSA DE BOVINO

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.



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.

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 Agujas 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 1.076-1.085

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



Técnica

La muestra de sangre se obtendrá del animal donador por la mañana y antes de la práctica. Previa sujeción del animal, se ubicará la vena yugular, se realizará 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 transporta 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 bom

PRÁCTICA No. 4

IDENTIFICACIÓN DE LINFOCITOS T DE BOVINO POR EL FENOMENO DE ROSETA CON ERITROCITOS DE OVINO

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 prominete ligeramente arriñonado, poco citoplasma y tamaño similar, aunque tienen grandes diferencias en su actividad en el sistema inmunocompetente, basta citar las 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 4oC. 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 par 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.



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Salud Animal*

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 sustancias

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%



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Salud Animal*

Equipo

Centrifuga clínica de 5000rpm.

Microscopio óptico

Cámara de Neubauer

Bioseguridad

Bata de laboratorio

Guantes de cirujano

Solución de hipoclorito de sodio al 2 %

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.

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 NO. 5

INMUNIZACION DE UN CONEJO CON UN ANTIGENO DE *Bordetella bronchiseptica* INACTIVADO.

INTRODUCCIÓN

El desarrollo de la respuesta inmune humoral tiene como consecuencia el incremento del nivel sérico de anticuerpos derivado de la exposición del organismo a un antígeno vacunal, el cual puede ser inactivado por métodos físicos y químicos para elaborar cierto tipo de vacunas. Los antígenos no inactivados son denominados modificados, los cuales corresponden a microorganismos modificados en su virulencia y patogenicidad mediante procedimientos de laboratorio conservando su viabilidad para multiplicarse al ser aplicados como vacunas en los animales.

El desarrollo de la respuesta inmune se caracteriza por dos fases que corresponden a la respuesta primaria y secundaria, una fase intermedia denominada de ventana, en la cual aparentemente el sistema inmune no muestra una aparente actividad en la producción de anticuerpos. El modelo de laboratorio desarrollado en un conejo donador pretende ilustrar el desarrollo de estas



fases, al aplicar un antígeno vacunal inactivado en un animal y la posterior determinación de los niveles séricos de anticuerpos en los diferentes días en el período de observación experimental, para evaluar la concentración en suero sanguíneo de los anticuerpos anti *Bordetella bronchiseptica*.

OBJETIVO

Evaluar el nivel sérico de anticuerpos contra *Bordetella bronchiseptica* en los días 0, 14, 28 y 42 días al aplicar el antígeno vacunal inactivado en modelo biológico basado en el conejo.

MATERIAL

- Biológico
 - Un conejo macho adulto de la raza Nueva Zelanda
 - Antígeno inactivado de *Bordetella bronchiseptica* x 10^{-8} mL., suspendido en hidróxido de aluminio y magnesio.
 - Médico clínico
 - Jeringa desechable de 3mL., con aguja calibre 21
 - Jeringa hipodérmica desechable de 3mL., con aguja calibre 24
 - Torundas impregnadas de alcohol etílico 70 % v/v.
 - Tubo separador de suero
 - De campo
 - Alimento comercial para conejos en fase adulta
 - Jaulas metálicas
 - Implemento para la sujeción cervical de conejos integrado a una base móvil.
 - Bioseguridad
- Cubrebocas



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Salud Animal*

- Bata de laboratorio
- Guantes de látex de cirujano
- Botas de hule
- Contenedor para objetos punzo cortantes
- Bolsa para residuos biológicos no infecciosos
- 5.De laboratorio
- Refrigerador
- Congelador -70°C
- Centrifuga con rotor de 5000 rpm
- Aguja metálica de 14 X 100 mm para tubos de Wintrobe
- Aglutinoscopio
- Termómetro de 0 a 100°C
- Pipeta tipo Pasteur con bulbo de goma
- Micropipeta de 20µl.
- Solución salina fosfatada pH 7.4
- Crioviales de 1.8 mL.

MÉTODO

CONDICIONES DE LA PRUEBA

El manejo de los animales realizara en consideración a los criterios de la bioética y con lo establecido en la NOM-062-ZOO-1999 y NOM -033-ZOO-1999.

PROCEDIMIENTO



Se aplican por vía intramuscular en una zona por embrocación con alcohol etílico 70% 0.5mL del antígeno inactivado; los días 0 y 14.

La obtención de muestras de sangre de 4 a 5 mL., se realiza los días 0, 14, 28 y 42. Cada una de las muestras recién obtenidas se vacía en los tubos separadores de suero, para su centrifugación a 2500rpm durante 10 minutos, el suero se extrae con una jeringa equipada con la aguja de 14 X100mm. Posteriormente se alicuota y congela a -70°C. Para su ulterior proceso las muestras de suero se mantienen a -20°C durante tres horas y finalmente a 4°C. En las celdas de la placa del aglutinoscopio se depositan 20 µl de la solución salina fosfatada y 20 µl del suero problema, se homogeniza la suspensión y se realizan diluciones dobles seriadas. Finalmente se depositan 10 µl del antígeno de *Bordetella bronchiseptica* libre del adyuvante, se homogeneiza la suspensión y se reposa durante dos minutos para observar el título de la aglutinación.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Al apreciar una ligera precipitación al centro con floculación de leve a intensa, la cual puede desaparecer a la dilución mayor.

RESULTADOS

En la dilución que se produzca la aglutinación se expresa como el título recíproco negativo de la dilución anterior.

RECOMENDACIONES

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



PRÁCTICA No. 6

EVALUACION DE LA INMUNIDAD PASIVA EN EL NEONATO

INTRODUCCIÓN

En el ternero al momento del parto se produce la transferencia de inmunoglobulinas séricas a través del calostro y su absorción intestinal favorecida por la permeabilidad incrementada del intestino, en las primeras horas de vida después del amamantamiento del calostro de la madre. La inmunidad pasiva en el rumiante neonato depende de la transferencia trascalostral de inmunoglobulinas maternas. Debido a la nula transferencia al producto de inmunoglobulinas a través de la placenta, por esta razón el ternero nace agamaglobulinémico y una vez que este ingiere calostro, las inmunoglobulinas se absorben inmediatamente y se redistribuyen en el organismo dentro de las primeras 72 h, para mantener la isogamaglobulinemia durante algunas semanas durante el período de lactancia. Los terneros que no se amamantan son considerados agamaglobulinémicos y los que recibieron una baja dosis de calostro se consideran hipogamaglobulinémicos además de incrementar el riesgo de adquirir infecciones neonatales que pueden comprometer la vida del recién nacido. A diferencia del incremento en la viabilidad de los animales que recibieron cantidades adecuadas de calostro al nacer.

OBJETIVO

Evaluar cualitativamente los niveles séricos de inmunoglobulinas en los terneros recién nacidos como indicador de la transferencia materno neonatal trascalostral de inmunoglobulinas.

MATERIAL

- Biológico
 - Una muestra de suero sanguíneo de ternero recién nacido sin administra calostro
 - Una muestra de suero del ternero 24 horas después de amamantarse
 - Una muestra de suero de un ternero destetado



- Médico clínico
- Jeringa desechable de 5mL., con aguja calibre 20
- Jeringa hipodérmica desechable de 3mL., con aguja calibre 24
- Compresa de gasa de algodón
- Estuche de disección
 - De campo
- Caja refrigerante a 4°C
- Tubos separadores de suero al vacío
 - Bioseguridad
- Cubrebocas
- Bata de laboratorio
- Guantes de látex de cirujano
- Botas de hule
- Bolsas de material biológico no infeccioso
- Recipiente de objetos punzo cortantes
 - De laboratorio
- Centrifuga clínica con rotor de 5000 rpm
- Pipeta Pasteur con bulbo de goma
- Crioviales de 1.8mL.
- Congelador a -70°C
- Congelador a -20°C

CONDICIONES DE LA PRUEBA

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 y NOM-033-ZOO-1999.



PROCEDIMIENTO

De los terneros se obtendrá una muestra de sangre de 5 a 7mL, con la ayuda del equipo de punción venosa de sistema vacutainer con el tubo separador, el cual se deposita en la gradilla de la caja refrigerada. Posteriormente se centrifuga a 2500rpm durante 15 minutos, el suero se colecta del tubo separador y se deposita en los crioviales para ser congelado a -70°C hasta su uso. Al proceder a determinar las inmunoglobulinas, la muestra de suero se mantiene a -20°C durante una hora y otra a 4°C . El procedimiento para la determinación cualitativa de inmunoglobulinas se realizara a temperatura ambiente. Se preparan 7 tubos de 6 ml., de una solución de sulfato de zinc 208 mg/L como control al los cuales se les adicionan proporcionalmente 100 μl de albúmina sérica bovina en suspensión a concentraciones g/L de; 0, 2, 4, 6, 8, 10 y 12. Los tubos de prueba de cada muestra de los animales, contengan solamente el sulfato de zinc en solución, al cual se le agregaran 100 μl de los sueros problema. Los tubos se homogenizan manualmente con movimientos en abanico durante tres minutos y se reposan durante dos minutos.

LECTURA E INTERPRETACIÓN

Los tubos de 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.

RESULTADOS

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

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



Valor de la prueba

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 y las diferentes concentraciones de albumina serica se adicionan una hora antes de efectuar la prueba cualitativa. Los tubos de prueba con el suero problema se preparan al momento. Es importante observar los tiempos de empORIZADO de los sueros congelados, evitar descongelar y volver a congela 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 No. 7

PRUEBA DE AGLUTINACIÓN

INTRODUCCIÓN

La prueba de Tarjeta o Card Test, es una prueba de aglutinación que se usa para detectar hatos sospechosos con problemas de brucelosis., esta enfermedad aun afecta a la ganadería del país, produce grandes perdidas económicas y es un importante problema en salud pública y por lo tanto es una importante zoonosis, la enfermedad afecta principalmente al sistema reproductor de los animales afectados originando 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 a los programas de control de la infección en los animales y principalmente como resultado de la respuesta inmune del hato.

OBJETIVO

Detectar anticuerpos contra *Brucella abortus* en suero sanguíneo.



MATERIALES

- Placa de vidrio
- Aglutinoscopio
- Centrifuga clínica
- Micropipeta de 5-50, 50-200, 200-1000
- Puntas de plástico
- Palillos o removedores
- Reloj marcador
- Guantes
- Suero sanguíneo de animales vacunados y no vacunados
- Antígeno de tarjeta al 8%
- Suero control positivo
- Suero control negativo
- Jabón extra
- Solución hipoclorito de sodio 2%
- Recipientes
- Bolsas para eliminar basura

CONDICIONES DE LA PRUEBA

Los sueros y el antígeno deberán estar 30 minutos a temperatura ambiente antes de realizar la prueba y no deberán estar hemolizados ni contaminados.

PROCEDIMIENTO:

1. Colocar 30 μ l de suero en cada cuadro de la placa de vidrio.
2. Mezclar el antígeno y depositar 30 μ l casi junto, a cada suero que se encuentra en cada uno de los cuadros.
3. Mezclar el suero más el antígeno con movimiento de rotación, utilizando un palillo para cada suero
4. Mezclar por rotación manual la placa durante 4 minutos y realizar la lectura en un aglutinoscopio.

RESULTADOS: 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.

PRACTICA No. 8

PRUEBA DE ANILLO EN LECHE

INTRODUCCIÓN

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.

No debe aplicarse la prueba en calostro, leche con mastitis, leche de caprinos, leche homogeneizada y el resultado positivo deberá confirmarse con pruebas serológicas.

La muestra se recolectará 24 horas antes de la realización de la prueba y en muestras refrigeradas por no más de 3 días.

OBJETIVO

Detectar anticuerpos anti- *B. abortus* en leche.

MATERIALES

- Incubadora a 37°C ó Baño María a 37°C
- Leche entera de bovino
- Gradilla para tubos
- Antígeno de *B. abortus* 4%
- Tubos vidrio 13X100mm
- Solución hipoclorito de sodio 2%
- Refrigerador



- Micropipetas de 5-50 y 200-1000
- Puntas de plástico
- Reloj marcador
- Plumón

PROCEDIMIENTO

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.
6. Incubar los tubos a 37°C durante 1 hora en baño maría o en incubadora bacteriológica.

RESULTADOS: LECTURA E INTERPRETACIÓN

Negativo: La columna de leche se observa homogéneamente coloreada.

Una reacción Positiva es 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.



PRÁCTICA No. 9

EVALUACIÓN DE LA REACCIÓN DE HIPERSENSIBILIDAD IV

Cuando los animales han sido sensibilizados contra determinados antígenos y se les inyecta en la piel algunos de éstos, en el sitio de aplicación pueden presentarse una respuesta inflamatoria 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 (el 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* y, 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.

OBJETIVO

Detectar animales positivos a la tuberculosis mediante esta prueba.

MATERIALES

- Overol
- Botas de hule
- Cuerdas de sujeción
- Jeringas de Tuberculina Estériles, en buen estado de 1.0 ml graduada en 0.1 ml. con agujas calibre 24 a 26 de 0.5 a 1.0 ml de largo
- Caja de poliuretano con Refrigerantes
- Libro de anotaciones



- Reactivo PPD bovino
- Reactivo PPD aviar

PROCEDIMIENTO

Prueba Caudal

1. Inmovilización del animal
2. Limpiar la zona del pliegue ano caudal en donde se aplica 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.

RESULTADOS: LECTURA E INTERPRETACIÓN

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

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

Animal Reactor (Reacción Positiva): Cuando es visible y a la palpación existe cualquier engrosamiento: rubor, calor dolor o necrosis del tejido en el sitio de inoculación.

RECOMENDACIONES

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

Prueba cervical comparativa

OBJETIVO

Confirmar o descartar animales reactivos a la prueba caudal



PROCEDIMIENTO

1. Rasurar el tercio medio superior del cuello como se indica:
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 se mide el grosor de estos mediante un cutímetro (vernier o pie de ángel).
5. La lectura se redondea 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. Inocular por vía intradérmica 0.1 ml de PPDF aviar el sitio superior.
7. De la misma manera, inocular 0.1 ml de PPD bovino en el sitio inferior.
8. Lectura de la prueba a las 72 Hr post inoculación (mas o menos 6 horas) .

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



PRÁCTICA No. 10

PRUEBA DE HEMOAGLUTINACIÓN E INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN

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.

OBJETIVO

Determinación de las unidades hemoaglutinantes UH del virus de la enfermedad del Newcastle.

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
- Centrifuga 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.

PROCEDIMIENTO

Estandarización de las UH del virus hemoaglutinante

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 esta 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 número 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.
8. Leer la prueba al término del período de incubación. El título hemoaglutinante del “antígeno” es la dilución mas alta donde existe completa hemoaglutinación y es una unidad HE. Determinar 10 UH para la prueba de HI.



RESULTADOS: LECTURA E INTERPRETACIÓN

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

PRÁCTICA No. 11

PRUEBA DE INHIBICIÓN DE LA HEMOAGLUTINACIÓN HI

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.

OBJETIVO

Detección de anticuerpos contra el virus de la enfermedad del Newcastle.

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.

PROCEDIMIENTO

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



RESULTADOS: LECTURA E INTERPRETACIÓN

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

El título final de un suero es la recíproca de la dilución mas 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 mas el antígeno y antes de la segunda incubación final de la prueba.

1. Depositar en el primer pozo 100 μ l de antígeno de 10 unidades. En los demás pozos adicionar 50 μ l ml 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.



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Salud Animal*

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 mas alta que inhibe la aglutinación de eritrocitos.

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



Universidad Autónoma del Estado de México

*Secretaría de Docencia
Coordinación General de Estudios Superiores
Salud Animal*

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.