

ORGANIZACIÓN DE LA SECCIÓN DE INMUNOLOGÍA

Autora

Dra. Elena Kokuina

Departamento

Laboratorio Clínico

CONTENIDO

- Inmunocomplejos circulantes por precipitación con polietilenglicol 6000
- Factor reumatoideo
- Aislamiento de linfocitos
- Tipaje HLA A, B, C
- Cross-match
- Tipaje HLA-DR-DQ
- Inmunoelectroforesis
- Inmunoelectroforesis en orina
- Técnica de determinación de complemento hemolítico CH50
- Microesferas hidrofílicas para determinación de fagocitosis de leucocitos
- Marcadores linfocitarios
- Oponización y fagocitosis
- Anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta en corte de hígado de rata
- Anticuerpos órgano-específicos por inmunofluorescencia indirecta en corte de tejido
- Cuantificación de inmunoglobulinas, C3 y C4 por turbidimetría
- Cuantificación inmunoglobulinas C3/C4 inmunodifusión radial
- Cuantificación de IgG y/o albúmina en LCR
- Detección anticuerpos antitiroglobulina por hemaglutinación pasiva con cloruro de cromo
- Crioglobulinas
- Congelación de linfocitos
- Adherencia leucocitaria
- Anticuerpos antiplaquetarios

Tubo 1: 2 mL de buffer borato + 0.22 mL del suero diluido.

Tubo 2: 2 mL de PEG + 0.22 mL del suero diluido.

Se incuba 60 min a temperatura ambiente.

Se lee en un espectrofotómetro a 450 nm.

Se resta a la lectura del tubo 2, la lectura del tubo 1.

Valores normales

$\leq 0,080$

Factor reumatoideo

Material	Reactivos
-Placa de fondo oscuro	• Solución salina 0,9 %
-Pipetas de 10 mL	• Partícula de látex recubiertas con IgG humana

Principio

La detección del factor reumatoideo (FR) por aglutinación en lámina de las partículas de látex revestidas con gammaglobulina humana (IgG) por sueros-problema que contienen FR, es una reacción inmunoquímica.

BIO MERIEUX

Procedimiento

Suero diluido 1/20: 950 µL diluyente (solución salina)
 50 µL suero del paciente

Se colocan sobre una lámina de fondo oscuro (negro):

- ✧ 50 µL del suero diluido + 50 µL de la suspensión acuosa de partículas de látex recubiertas con gammaglobulina humana; mezclar con un removedor.
- ✧ Se observa la aglutinación de las partículas de látex a los 5 min.

BEHRING

Procedimiento

Igual que el anterior.

Suero diluido 1/6: 250 µL del diluyente
 50 µL del suero

Se colocan sobre una lámina de fondo oscuro (negro):

- ✧ 40 µL del suero diluido + 40 µL de la suspensión acuosa de partículas de látex recubiertas con gammaglobulina humana; mezclar con un removedor.
- ✧ Se observa la aglutinación de las partículas de látex a los 5 min.

Látex: Partículas de poliestireno.

Aislamiento de linfocitos

<i>Materiales</i>	<i>Reactivos</i>		<i>Equipos</i>
-Tubos fondo en U -Gradilla -Pipetas 10 mL	-Liquemine -Ficoll -NaCl -Na ₂ HPO ₄ -KHCO ₃	-KH ₂ PO ₄ -EDTA -Ac.acético glacial -Cristales violeta -Tripan azul -H ₄ CL	-Centrifuga refrige- rada -Microscopio óptico

Soluciones

Sol. salina

PBS pH 7.4	NaCl.....	38.25 g
	Na ₂ HPO ₄ ...	3.62 g
	KH ₂ PO ₄	1.05 g
	H ₂ O d.....	hasta 5 L
FICOLL	Ficoll....	11.25 g
	H ₂ O.....	125 mL

Se deja reposar 24 h a 4°C y se ajusta la densidad d=1.077 g/mL con Telebrix o agua destilada.

Sol. Turk` s	Acido acético glacial.....	2 %
	Cristales violeta	0.1 %
Tripan Azul	Tripan azul...	1 g
	Sol. salina...	100 mL

Se filtra con papel de filtro

Cloruro de Amonio pH 7.2-7.4

NH ₄ CL.....	8.26 g
KHCO ₃	1 g
EDTA.....	0.044 g
H ₂ O d.....	hasta 1 L

Principio

Se separan los diferentes componentes celulares de la sangre mediante un gradiente de densidad discontinuo.

Descripción

- Se añaden entre 10 y 50 UI de liquemine sin preservo por mL de sangre extraída por punción venosa o se utilizan 2 perlas de vidrio por mL de sangre, para desfibrinar.

- Posteriormente se mezcla la sangre 1:2 ó 1:3 con NaCl 0.9 %, PBS o medio de cultivo con o sin suplemento de suero bovino fetal o suero AB. La solución con que se diluye la sangre depende de los requerimientos de la técnica para la cual se haga el aislamiento.
- La sangre diluida se coloca cuidadosamente sobre Ficoll-Paque o Ficoll-Terebrix densidad $d=1.077$ g/mL, se centrifuga entre 15-30 min a 700 g.
- Sacar cuidadosamente las células mononucleares de la interfase con una pipeta pasteur y realizar 2 lavados con PBS a 250 g 10 min. Si se desea puede realizarse un lavado a 100 g 10-15 min. para eliminar plaquetas.
- Se ajustan las células a la concentración deseada.

Procedimiento

- Utilizar 240 μ L de liquemine x mL sangre extraída por punción venosa.
- Mezclar la sangre 1:2 con PBS.
- Tomar 5 mL de la sangre diluida y se coloca cuidadosamente sobre Ficoll-Paque o Ficoll-Terebrix densidad $d=1.077$ g/mL, se centrifuga 30 min a 2500 rpm a 20°C.
- Sacar cuidadosamente las células mononucleares de la interfase con pipeta pasteur.
- Realizar 2 lavados con PBS 1500-1800 rpm 10 min a 4°C; puede realizarse un lavado entre 800 y 1000 rpm 10-15 min. para eliminar plaquetas.
- Si hay contaminación con hematíes después del primer lavado se lisan con 1 mL de cloruro de amonio 10 min a 4°C y realiza otro lavado.
- Ajustar la concentración de células para lo cual se realiza dilución 1:20 tomando 380 μ L de sol. Tur'k y 20 μ L de la suspensión celular.
- Contar las células en la cámara de Neubauer, en los 4 cuadrantes externos; multiplicar por 50 y por 1000 (se multiplica por 50 ya que se leen en la cámara 0.4 μ L de la suspensión de células al multiplicar por 2.5 se calcula la concentración de células por μ L pero la lectura se realizó en una dilución 1:20 por lo que se multiplica por 20 calculando así la concentración de células en la suspensión inicial [$2.5 \times 20=50$]; si multiplicamos por 1000 da la concentración de células/mL).
- Si el volumen inicial de la suspensión celular es diferente de 1 mL, multiplicar el resultado por el volumen inicial y da la concentración/mL.

$$\# \text{ de cel leído} \times 50 \times 1000 = [\text{cel}] / \text{mL}$$

llevar de 0.4 μ L a 1 μ L de una dil 1:20 a la suspensión inicial	llevar de 1 μ L a 1 mL
--	----------------------------

Teniendo la concentración de células/mL aplicamos la formula

$$C1 \times V1 = C2 \times V2$$

Donde

C1----[cel]/mL que se tiene.

C2----[cel]/ mL con que se desea trabajar.

V1----volumen que tenemos.

V2----volumen final para la concentración deseada.

$$V2 = \frac{C1 \times V1}{C2}$$

Tipaje HLA A, B, C

Soluciones

Sol. Hank's..	Matriz de Hank's	50 mL
	Agua destilada	5 000 mL
	ajusta pH	7-7.5
	se esteriliza	121°C x 20 min.
Sol. Turk's..	Ac. acético 2 %	
	Cristal violeta 0.1 %	
Tripan azul..	Tripan azul	1 g
	Solución salina	100 mL
	se filtra con papel de filtro	
Formalina....	Rojo fenol	1 mL
	Formaldehido 37 %	99 mL
	Ajustar pH	hasta color rojo salmón
	Agua destilada	100 mL
Ficoll.....	Ficoll	11.25 mg
	Telebrix 80	1 amp.
	Agua destilada	125 mL
	Ajusta densidad	1070
	Se deja reposar	24h a 4°C
	Esterilizar 12 min a	121°C
	Cristal violeta 0.1 %	

Materiales

✧ Placas de Terasaki

- ✧ Cámara de Neubauer

Equipos

- ✧ Microscopio de contraste de fase
- ✧ Centrífuga
- ✧ Microscopio óptico

Reactivos

- ✧ Antisueros anti HLA clase
- ✧ Suero de conejo

Principio

- Unión del anticuerpo específico con el antígeno HLA clase I de la superficie celular, se añade complemento y se produce lisis celular. Las células muertas se tiñen con un colorante supravital mientras las células vivas se observan refringentes.

Procedimiento

- Se realiza un aislamiento de linfocitos totales.
- Se ajustan las células entre 1 y 3 millones/mL.
- Se colocan en placa de Terasaki 1 μ L de antisuero HLA por pozuelo.
- En el momento del uso se añaden 1 μ L de la suspensión celular y se incuba durante 30 min.
- Posteriormente se añaden 5 μ L de suero de conejo como fuente de complemento, se incuba durante 1 hora.

Se tiñe con eosina 5 μ L y después de 5 min se añade 5 μ L de formalina, se coloca un cubre de cristal fino y se lee en un microscopio invertido de contraste de fase, 24 horas después, en la forma rápida puede leerse 15 min después.

Lectura

<i>Lectura (score)</i>	<i>Valoración</i>	<i>% células muertas</i>
8	Fuertemente positivo	80-100
6	Positivo	40-80
4	Dudoso positivo	20-40
2	Dudoso negativo	10-20
1	Negativo	< 10
0	No testado	-

Cross-match

- Se realiza el procedimiento igual que en el acápite anterior, sólo que en lugar de utilizar placas de Terasaki con antisueros anti-HLA, se prepara una placa recubierta con parafina líquida donde se inyecta con pipeta Hamilton de 50 μ L, suero del receptor que se enfrentará con las células mononucleares del donante (aisladas mediante Ficoll-Paque). Habitualmente se utilizan pozuelos con suero AB como control negativo y con un poliespecífico como control positivo.
- Puede usarse el suero del paciente 3 μ L, 2 μ L, 1 μ L y diluciones dobles.
- Aunque los pozuelos se leen en el *score* de "8" el resultado final se informa como positivo o negativo. Los "4" se informan como positivos.
 - ✧ El cross-match puede realizarse a linfocitos totales, células B y células T, y puede realizarse a diferentes temperaturas: 37°C, 20°C y 4°C.

Tipaje HLA-DR-DQ

Principio

- Aprovechando la propiedad de los linfocitos B de adherirse a la fibra de nylon, esta se utiliza para separación de células T de B. Este método permite un enriquecimiento de células B de 70-80 %.

Procedimiento

Se prepara una columna de separación de la siguiente forma:

- Se utiliza una jeringuilla de 5 mL, a la cual se le introduce 0.2 g de fibra de nylon y se lava con HCL 0.2 N y agua destilada estéril alternativamente, 50 mL de ácido y 50 mL de agua, se realizan 5 lavados.
 - ✧ Comenzar con HCl 10 mL.
 - ✧ Agua destilada 10 mL.
 - ✧ Lavar con medio 199 50 mL y antes de añadir las células se enriquece con SBF 20 % y se incuba 30 min a 37°C.
 - ✧ Eliminar el medio de cultivo y se añaden las células gota a gota resuspendidas en medio de cultivo, se incuba 30 min a 37°C.
 - ✧ Lavar la columna con 15 mL de medio 199 a 22°C y en este lavado se obtienen las células no adheridas (células T).
 - ✧ Lavar la columna con 50 mL de medio 199 20 % con suero bovino fetal a temperatura ambiente.
- La fibra de nylon se coloca en una placa de Petri y se lava con 15 mL de medio 199 a 4°C para obtener las células B.
- Se ajustan las células entre 1 y 3 millones/mL.

- Se coloca en una placa de Terasaki 1 μ L de antisuero HLA clase II por pozuelo, en el momento del uso se añade 1 μ L de la suspensión celular y se incuba durante 60 min.
- Posteriormente se añaden 5 μ L de suero de conejo como fuente de complemento y se incuba durante 2 horas.
- Se tiñe con eosina 5 μ L y después de 5 min. se añaden 5 μ L de forma-lina, se coloca un cubre de cristal fino y se lee en un microscopio invertido de contraste de fase, 24 horas después; en la forma rápida puede leerse 15 min. después.

Lectura

Lectura (score)	Valoración	% células muertas
8	Fuertemente positivo	80-100
6	Positivo	40-80
4	Dudoso positivo	20-40
2	Dudoso negativo	10-20
1	Negativo	< 10
0	No testado	-

Inmunoelectroforesis

Buffer de cubetas

- ✧ 51.5 g de barbitol sódico
- ✧ 9.2 g de ácido barbitúrico (dietil).

Disolver en 1 L de agua hirviendo; enfriar; llevar a 5 L con agua destilada; añadir 1 mL de mertiolate 1:100; ajustar pH 8.6 con NaOH o HCl.

- ✧ Agar de fijación: agar 3 % en agua destilada.
- ✧ Agar placas: agar 1.5 % en buffer de cubetas.

Materiales	Reactivos		Equipos
-Placas de cristal -Nivel -Mechero -Molde -Perforador -Micropipetas* -Cámara húmeda	- Barbitol sódico -Ácido barbitúrico o ácido dietil barbitúrico -Amido negro -Glicerina -Agar noble -Ácido acético	-KH ₂ PO ₄ -EDTA -Ac.acético glacial -Cristales violeta -Tripán azul -H ₄ CL	-Cubeta electroforesis -Fuente de poder -Negatoscopio -Balanza analítica -Pietro -Incubadora 37°C -Estufa

(*) 5 y 100 μ L

- ✧ Sol. colorante

Negro amido:

Negro amido	5 g
Metanol	450 mL
Agua	450 mL
Ácido acético	50 mL

Dejarlo agitando toda la noche y después filtrarlo.

✧ Sol. decolorante

Metanol	475 mL
Agua	475 mL
Ac.acético	50 mL

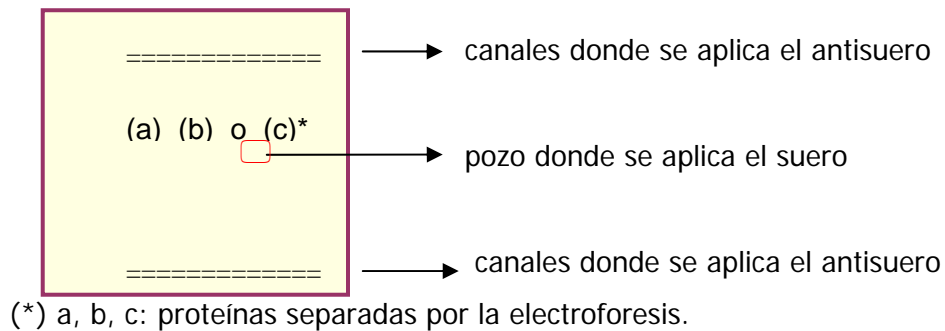
Principio

- Esta técnica es la combinación de dos métodos: la electroforesis de proteínas en gel y la inmunodifusión. La electroforesis de proteínas separa las proteínas colocándolas en un campo eléctrico, aplicando una diferencia de potencial; éstas migran según su carga eléctrica y posteriormente se realiza la inmunodifusión con el antisuero total o monoespecífico. Es una técnica cualitativa y semicuantitativa, (esta última realizando diluciones de la muestra).

Procedimiento

- Utilizar placas de cristal que se limpian con alcohol.
- Rotular las placas y se flamea la rotulación.
- Añadir varias gotas de agar de fijación y se esparcen en la lámina; se secan en la estufa a 100°C.
- Poner la placa sobre un nivel y se vierte el agar con una pipeta cantidad de agar en mL= largo de la placa (cm) x ancho (cm) x 0.3.
- Marcar los pozos y canales y se remueven por succión los pozos solamente.
- Llenar los pozos con 5 µL de la muestra.
- Colocar en la cámara de electroforesis durante 90 min., a 100-150 volts (6 volts x cm de la placa).
- Llenar los canales con 50 µL del antisuero.
- Dejar durante la noche en cámara húmeda a 37°C a temperatura constante.
- Lavar por 72 horas en solución salina y se enjuagan con agua destilada en cada cambio de salina.
- A las 72 h se enjuagan las placas con agua destilada y se cubren con papel de filtro (watman 20).

- Dejar secar a temperatura ambiente durante la noche.
- Remover el papel con agua corriente.
- Colorear con amido negro aplicándolo sobre la superficie del agar con una brocha por 20 min.
- Lavar la placa con agua corriente.
- Lavar 3 veces con solución decolorante.
- Lavar con agua destilada y se dejan secar.



Causas de error en la IEF

- Una corrida muy corta o muy larga puede traer problemas interpretativos.
- El canal muy corto o mal cortado, distorsiona las líneas.
- La contaminación bacteriana o la degradación de las proteínas, conlleva a la distorsión y cambia la movilidad electroforética de las proteínas.
- Cuando se analizan las proteínas de Bence Jones se debe observar la precipitación cada 30 min. para evitar la pérdida de las líneas precipitantes debidas a la rápida difusión del antígeno al pozo del antisuero.
- Las líneas de precipitación pueden ser observadas antes de las 18-20 h. cuando se tiene una temp. ambiente mayor.
- El succionar el agar de los canales antes de la corrida puede conllevar distorsión de las líneas.

Inmunoelectroforesis en orina

- Se realiza exactamente igual a la IEF sérica con la diferencia de que el pozuelo en lugar de 5 μ L, debe ser de 50 μ L. Esto es más recomendado que concentrar la orina pues no se desnaturalizan las proteínas.

✧ Cadenas ligeras en orina. Proteínas de Bence-Jones

Principio

- Las cadenas ligeras de las inmunoglobulinas presentes en la orina pueden ser clasificadas mediante inmunodifusión doble (Ouchterlony)

utilizándose antisueros específicos anti-kappa y anti-lambda (*free*), los cuales sólo reaccionan con cadenas ligeras libres.

Procedimiento

- Preparar agarosa 1.5 % en buffer veronal pH 8,6
- Verter caliente sobre una lámina de cristal y se deja solidificar.
- Perforar pozuelos de 5 μ L para el antisuero y de 100 μ L para orina.
- Aplicar las muestras y a 24-48 horas ocurre la inmuno-precipitación.
- Lavar las placas en solución salina; se secan con papel de filtro durante 24 horas y se colorean con azul de Coomasie.

Técnica de determinación de complemento hemolítico CH50

<i>Materiales</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Equipos</i>
-Papel log-log -Tablas log y/y-1 -Fascos de 1 L (2) -Elermeyer* -Agua desionizada** -Eritrocitos carnero	-Barbital sódico -NaCl ₂ -Ácido dietilbarbitúrico -Ácido cítrico -MgCl ₂ -Na ₂ CO ₃ -CaCl ₂ -Citrato sodio -Glucosa	-Baño de María c/agitador -Espectofotómetro 541 nm -Colorímetro filtro 550 nm -Agitador de tubo -Bomba de vacío -Congelador -60°C a -80°C

(*) de 100, 200 y 50 mL (**) > 300,00 Ω

Buffer matriz (para trabajar se diluye 1/5 y el buffer sobrante se desecha)

	2 L	1 L	500 mL
NaCl	85 g	42,5 g	21,25 g
Barbital sódico	3,75 g	1,875 g	0,9375 g
Ácido dietilbarbitúrico*	5,75 g	2,875 g	1,4375 g

(*) agua desionizada caliente

Se mezclan ambas soluciones y cuando está fría se le añade:

	2 L	1 L	500 mL
MgCl ₂ 1M	5 mL	2,5 mL	1,25 mL
CaCl ₂	1,5 mL	0,75 mL	0,375 mL

Se enrasa y se ajusta el pH a 7,4 a 4°C

Solución ALSEVER

Dextrosa..... 20 g.....22 g (H₂O)
Citrato de trisodio.. 8 g..... 9.1 g (2H₂O)

NaCL..... 4.2 g

Para 1 000mL de agua destilada ajustar pH 6.1 con ácido cítrico 10 %

NaCO₃ 0.1 %.

Principio

- La hemólisis de eritrocitos de carnero mediada por anticuerpos específicos de la clase IgM en presencia de complemento puede ser empleada como una prueba escrutadora de la actividad del complemento en el suero humano siguiendo el método propuesto por Meyer. La hemólisis se mide espectrofotométricamente como la absorbancia de la hemoglobina liberada y puede relacionarse directamente con el número de eritrocitos lisados. La unidad CH₅₀ es arbitraria y se define como la cantidad de complemento necesaria para la lisis de 50 % de los eritrocitos en condiciones estándar rígidas de sensibilización de la hemolisina.

Procedimiento

- Se diluye el buffer matriz 1:5 en agua destilada.
- Se diluyen los sueros 1:100.
- Se toman X mL de suero de carnero en Alsever y se lavan 3 veces en buffer de complemento diluido 1:5. Centrifugar 2500 rpm 10 min.
- Diluir *pellet* de eritrocitos de carnero 1:19 con buffer diluido 1:5 pH 7,4
- Tomar 1 mL de suspensión anterior y se añade 14 mL de NaCO₃ 0.1%.
- Leer a 541 nm contra buffer diluido. La lectura debe dar 0.700 para que corresponda a una suspensión que contiene 500 millones de células.
- Si la lectura da > 0.700 se ajusta la suspensión mediante la fórmula:

$$V_f = \frac{v_i \times DO \ M}{0,700}$$

- Si la lectura da menor de 0.700 se centrifuga de nuevo, se le quita parte del sobrenadante, se resuspende de nuevo el botón; se toma 1 mL en 14 mL de solución de carbonato y se lee a 541 nm. Queda una suspensión de hematíes 5 %.
- Esta suspensión se sensibiliza con hemolisina vol. a vol.; se sensibilizan 4 mL por cada paciente, más 2 mL, 1 para lisis total y 1 para blanco.
- Se incuba la suspensión con hemolisina 15 min. a 37°C. Queda una suspensión de eritrocitos sensibilizados 2.5 %.

Tubo	EA 2.5 %	Buffer C' 1:5 pH 7.4	Suero 1:100 NaCO₃
1	1 mL	4 mL	2.5 mL
2	1 mL	3.5 mL	3 mL
3	1 mL	3 mL	3.5 mL

4	1 mL	2.5 mL	4 mL	
Blanco	1 mL	6.5 mL	---	
Lisis total	1 mL	---	---	6.5 mL

Orden de añadir los reactivos:

1°- Buffer.

2°- Suspensión de hematíes (agitación constante).

3°- Suero problema.

✧ Se invierten los tubos 3 veces y se incuban 40 min a 37°C.

✧ Se centrifuga 10 min. a 2 500 rpm.

✧ Se lee a 541 nm.

Microtécnica

<i>Tubo</i>	<i>E.A 2.5%</i>	<i>Buffer C 1:5</i>	<i>Suero 1:100</i>	<i>NaCO3</i>
1	50 µL	170 µL	80 µL	
2	50 µL	150 µL	100 µL	
3	50 µL	130 µL	120 µL	
4	50 µL	110 µL	140 µL	
LT	50 µL	-	-	250 µL
B	50 µL	250 µL		

Microesferas hidrofílicas para la determinación de la fagocitosis de leucocitos

Muestra	T-158
Tamaño	1.280 um
Polidispersión	0-1
Diluyente	Agua destilada
Almacenamiento	Suspensión original 4°C por 1-2 años suspensión diluida 4°C por 1-2 meses

Método

- Agitar bien antes de usarse. Se toman 10 mL de PBS (sol. salina balanceada con fosfato, pH 7.0-7.4); se añaden 0.3 mL de la suspensión de microesferas; para el almacenamiento de esta suspensión use un recipiente de cristal; no deben utilizarse superficies plásticas cargadas, ya que debido a la carga de las microesferas, se adhieren fuertemente a dichas superficies. Para almacenar por períodos cortos o durante la realización de la prueba, pueden utilizarse tubos de polipropileno.

- Mezclar 100 μL de sangre fresca heparinizada (max. 15 IU/mL) con 50 μL de la suspensión de microesferas; incubar durante 1 hora a 37°C, agitar solo ocasionalmente. No usar agitadores mecánicos! Hacer un extendido de sangre sobre una lámina portaobjeto, se fija con metanol y se tiñe con Giemsa o Wright (aproximadamente la mitad del tiempo de tinción de una lámina de sangre periférica).
- Se cuenta el porcentaje de células fagocíticas de un total de 200-300 células. Existen dos criterios de células fagocíticas: uno, aquellas con una o dos partículas fagocitadas y otro, aquellas con tres o más partículas fagocitadas (las microesferas se tiñen de azul oscuro).
- La muestra contiene azida sódica como preservio para el transporte. Como la azida sódica inhibe la fagocitosis es necesario lavar la suspensión con agua destilada antes de su uso (centrifugar a 400 g por 20-30 min, desechar el sobrenadante y añadir agua destilada hasta el volumen inicial y agitar fuertemente. Repetir tres veces).

Metodología

- Poner el baño a 37°C.
- Mezclar 50 μL de la solución de microesferas y 100 μL de sangre fresca heparinizada.
- Incubar 1 hora a 37°C.
- Teñir con Giemsa.
- Contar las células fagocíticas de un total de 300 células.
- Teñir con Giemsa: Se fija con metanol, se deja secar y se tiñe con Giemsa 1:3 durante 7-8 min. se enjuaga y se deja secar.
- Valores normales:
 - ✧ Células fagocíticas (37 %-62 %).
 - ✧ Células fagocíticas (23 %-55 %).

Marcadores linfocitarios

Materiales	Reactivos	Equipos
-Tubos -Láminas porta objetos -Pipetas	-Anticuerpo monoclonal para marcadores de superficie de cél B y cél T conjugado anti-Ig + sustancia fluorescente	-Centrifuga -Microscopio de fluorescencia

Soluciones:

PBS pH 7.2-7.4	NaCl.....	38.25
	N ₂ HPO ₄	3.62
	KH ₂ PO ₄	1.05

Principio

- Unión del anticuerpo específico con el antígeno de la superficie de los linfocitos y se evidencia la unión utilizando una anti-Ig conjugada con una sustancia fluorescente.

Procedimiento

- Aislamiento de linfocitos.
- Se ajusta la concentración de células a 10 millones/mL.
- Se toman 5 μ L del anticuerpo monoclonal específico (reconstituido) [según lote utilizado] para las diferentes moléculas que se encuentran en la superficie celular.
- Añadir 100 μ L de la suspensión celular y se incuban 30 min. a 4°C.
- Lavar 3 veces con PBS; se centrifuga 7 min. 1 500 4°C.
- Añadir 100 μ L del conjugado [conjugado IOR] diluido 1:30 y se incuba 30 min. a 4°C.
- Lavar 3 veces con PBS; se centrifuga 7 min. 1600 4°C.
- Leer en un microcopio de fluorescencia; se cuentan 200 cel. y se saca el porciento de células positivas para el marcador estudiado.

Opsonización y fagocitosis

Reactivos

-Ácido acético 3%

-NH₄CL

Soluciones

PBS stok

NaCL..... 36 g

Na₂HPO₄.. 7.4 g

Na₂HPO₄.. 18.5 g (12H₂O)

KH₂PO₄... 2.15 g

H₂O..... 1 000 mL

pH..... 7.2

SOL. TURK`S

Acido acético glacial.... 2 %

Cristales violeta 0.1%

PBS

497.5 mL de sol. salina

2.5 mL de PBS stock

CLORURO DE AMONIO pH 7.2-7.4

NH₄CL..... 8.26 g

KHCO₃..... 1 g

EDTA..... 0.044 g

H₂O destilada hasta 1 L

Principio

- **Índice fagocítico:** disminución de las Cándidas libres por la actividad fagocítica de los PMN.
- **Índice opsonico:** favorece la fagocitosis por las opsoninas (IgG) presentes en el suero.

Metodología

- Sangre desfibrinada (15 mL) con perlas de vidrio.

Aislamiento de PMN

- Aislamiento de PMN utilizando gradiente de Ficoll: se colocan 20 mL de sangre desfibrinada diluida 1:2 con PBS sobre 10 mL de Ficoll.
- Sacar primero el anillo de linfocitos para evitar contaminación, después el sobrenadante y el Ficoll, manteniendo la capa de hematíes y PMN.
- Lavar añadiendo 20 mL de PBS y se centrifuga 10 min a 1 500 rpm, 4°C.
- Sacar cuidadosamente el sobrenadante y añadir NH₄CL hasta 45 mL; se revuelven bien y se ponen a 4°C de 10-15 min (hasta color rojo vino).
- Centrifugar 7 min a 1 500 rpm a 4°C; decantar el sobrenadante y se limpian las paredes del tubo.
- Realizar una segunda lisis con 15 mL de NH₄CL por 5 min. a 4°C.
- Centrifugar 7 min a 1 500 rpm a 4°C.
- Realizar lavado con 20 mL de PBS. Centrifugar 7 min a 1 500 rpm a 4°C.
- Decantar el sobrenadante y se añaden 10 mL de PBS para contar.
- Tomar 20 µL de células y 380 µL de Tur'k; se cuenta en cámara de Neubauer y se ajusta a 10 millones.

Ajustar la concentración de las Cándidas

- Colocar un tubo con 10 mL de PBS y se toma un fragmento de un cultivo de Cándidas en medio Sabouraud sólido y se agita.
- Centrifugar 10 min. a 2 500 rpm. Decantar el sobrenadante y se realiza otro lavado con 10 mL de PBS.
reconstituir con 10 mL de PBS.
- Tomar 2 mL de la suspensión de Cándidas y se añaden 3 mL de PBS.
- Tomar 20 µL de la suspensión de Cándidas y 380 µL de Tur'k
- Contar en cámara de Neubauer y se ajusta a 10 millones.
- Se preparan 9 tubos por paciente con 300 µL de ácido acético 3 % y se guardan en baño de hielo, para una vez comenzado el estudio detener la reacción a los tiempos requeridos.

- Poner en movimiento en baño de María a 37°C.

Índice	Susp Cándidas	Suero	SUSP. PMN
Opsónico	500 µL	100 µL (pte)	500 µL (donante grupo O)
Fagocítico	500 µL	100 µL (suero AB)	500 µL (pte)
Opsonofagocítico	500 µL	500 µL (pte)	100 µL (pte)

- ✧ Se toman 100 µL de cada muestra y se depositan en los tubos previamente preparados con ácido acético, en el tiempo:

to.... 0
t1.... 15 min.
t2.... 60 min.

- ✧ Se cuentan las Cándidas libres.

Valores normales

		X ⁻	2 DS	
Índice opsonofagocítico	t1 (15 min)	22.99-53.95 %	38.45 %	15.48
Índice opsonofagocítico	t2 (60 min)	6.63-28.43 %	17.53 %	10.90
Índice fagocítico	t1 (15 min)	23-75 %	49 %	26
Índice fagocítico	t2 (60 min)	5-37 %	21 %	16
Índice opsónico	t1 (15 min)	19.9-75.9 %	47.9 %	22.8
Índice opsónico	t2 (60 min)	6.5-34.1 %	20.3 %	13.8

Anticuerpos antinucleares por inmunofluorescencia indirecta en corte de hígado de rata

Soluciones y materiales

PBS

NaCL..... 36 g
Na₂HPO₄.. 7.4 g
Na₂HPO₄.. 18.5 g (12H₂O)
KH₂PO₄... 2.15 g

PBS stock

497.5 mL de sol. salina
2.5 mL de PBS stock
Láminas porta objetos con cortes de hígado de rata de 2-4 micras

H₂O..... 1000 mL

pH..... 7.2-7.4

Principio

- Los hepatocitos son células convenientes para usarlos como sustrato de una técnica para evaluar la presencia de anticuerpos antinucleares por la exposición de los antígenos nucleares. La unión de los anticuerpos se determina por inmunofluorescencia indirecta mediante la utilización de un antisuero anti-inmunoglobulinas humanas (G+A+M) conjugado a la fluoresceína.

Metodología

- Diluir el suero problema en solución salina o PBS (generalmente 1/10, y múltiplos 1/20, 1/40, etc. si se desea titular).
- Añadir 1 gota (o 50 microlitros) a las láminas porta previamente rotuladas con los cortes de hígado de roedor.
- Incubar 30 min. a temperatura ambiente.
- Lavar 2 veces en PBS (en *copins* o porta láminas). Las láminas deben estar sumergidas en PBS por 10 min para cada lavado con agitación suave.
- Ecurrir/colocar las láminas sobre superficie horizontal. Evitar desecación
- Añadir una gota (o 50 microlitros) de antisuero anti-inmunoglobulinas humanas (G+A+M) conjugado a la fluoresceína diluido previamente a la dilución óptima (el título de esta dilución se determinará previamente para cada antisuero conjugado).
- Incubar 30 min. a temperatura ambiente (en cámara húmeda cubierta con un paño para evitar exceso de iluminación).
- Dos lavados con PBS. Igual al paso 4.
- Ecurrir ligeramente, colocar cubre después de 1 gota de glicerol + PBS (8:1) y guardar en cámara húmeda a 4°C hasta el momento de la lectura.
- Leer en microscopio de fluorescencia. Determinando la presencia o no de los 4 patrones posibles:
 - ✧ Difuso u homogéneo
 - ✧ Periférico
 - ✧ Moteado o granular
 - ✧ Nucleolar

La intensidad de la fluorescencia puede medirse subjetivamente por el observador en una escala entre 0 y 4 cruces.

Preparación del suero control

- Se coleccionan 50 mL de suero negativo y positivo de ANA (patrones: *difuso, periférico y granular*)
- Se determina el título del suero control mediante 2-4 determinaciones.
- Se fracciona en 30 viales de 100 microlitros y se prueba en el mismo número de determinaciones los títulos de ANA

Anticuerpos órgano-específicos por inmunofluorescencia indirecta en corte de tejido

- La evaluación por IFI de la presencia de anticuerpos órgano-específicos se realiza exactamente como la metodología anteriormente descrita para los anticuerpos antinucleares, variando únicamente el tejido empleado y buscando los patrones de fluorescencia que corresponda:
 - ✧ Anti microsomales del tiroides tiroides humano grupo O
 - ✧ Anti mitocondriales riñón de rata
 - ✧ Anti músculo liso estomago de rata
 - ✧ Anti parietales estomago de rata
 - ✧ Anti célula β pancreática páncreas humano grupo O o mono

Cuantificación de inmunoglobulinas, C3 y C4 por turbidimetría

Principio

- La unión antígeno-anticuerpo (formación de un inmunocomplejo) en medio líquido puede medirse mediante cambios de turbidez. Tomando la absorbancia a la longitud de onda adecuada (340 nm) cuando mantenemos constante la concentración de uno puede calcularse la concentración del otro, en base a la rectificación de la zona de exceso de anticuerpos de la curva de precipitación. El método está automatizado en el autoanalizador Hitachi 704.

Metodología

- Diluir los sueros problemas, estándares y controles 1 en 20 en salina (800 μ L de solución salina + 40 μ L del suero)
- Colocar en el plato de reactivos del Hitachi 704 los reactivos 1 y 2 (1: antisuero en buffer, 2: suero precinorm U).
- Colocar los estándares en las posiciones programadas y las muestras de sueros problemas en el plato de muestras.
- Calibrar el equipo y ordenar la realización de los controles.
- Verificar si los valores obtenidos de los controles se encuentran dentro del rango permisible.

- Programar la identificación de los sueros problemas y las determinaciones a realizar. Ordenar su realización.
- Los resultados se obtienen automáticamente por *printer*.

Cuantificación inmunoglobulinas C3/C4 inmunodifusión radial

Principio

- En un rango de concentraciones relativas adecuadas de antígeno y de anticuerpo se produce una precipitación del inmunocomplejo formado, que en caso de efectuarse en medio semisólido (antisuero diluido en gel de agarosa y antígeno depositado en pozuelos perforados) se produce en forma de anillos de precipitación con diámetro cuadrado proporcional a la concentración del antígeno.

Metodología

Preparación de las placas:

- Pesar la cantidad de agarosa requerida para que al mezclarla con el buffer quede al 3 %.
- Colocarla al baño de María en agua en ebullición.
- En cuanto se observe disuelta y homogénea pasarla a un baño a 52°C.
- Mezclar el antisuero a utilizar en proporción adecuada (esto solo se sabe probando hasta encontrar la dilución óptima). Colocarlos en el baño a 52°C.
- Esperar unos 15 min tanto para la agarosa como para la dilución del antisuero. Mezclarlos a partes iguales (igual volumen de agarosa 3% que de antisuero en buffer). Mantenerlos en el baño a 52°C.
- Depositar con una pipeta caliente la cantidad necesaria como para formar una capa fina de gel sobre una placa de cristal recubierta con un poco de agar de fijación (embarrada con agar o agarosa y seca) o sobre placas plásticas que tienen reborde. Pueden reusarse placas plásticas comerciales para IDR.
- Guardar las placas así preparadas en el refrigerador (4°C) hasta el otro día para que el gel se endurezca.
- Horadar pozuelos para 5 μ L con un perforador de metal o plástico, eliminando el pedacito de gel por absorción con una manguera de goma.

Realización de la técnica

- Añadir 5 μ L de los sueros estándar y los sueros problemas, debiendo las placas estar bien rotuladas.
- Colocar todas las placas (preferentemente en cámara humera) a nivel.

- Incubar durante 52 horas (para la IgM se recomienda habitualmente más tiempo). Si se utilizan placas comerciales, a veces se recomienda menos tiempo de incubación, ver tiempo recomendado por el fabricante.
- Leer diámetros de los anillos de precipitación con regla de lectura que se ofrece al efecto por las firmas comerciales (esta permite leer en mm y décimas de mm).
- Realizar una curva estándar con los cuadrados de los resultados de los sueros standard en papel milimetrado y *plotear* los cuadrados de los diámetros de los anillos de precipitación de los sueros problemas encontrando en las ordenadas la concentración correspondiente en cada caso. Es preferible utilizar un programa de computación que disminuye la posibilidad de errores y aumenta la exactitud del resultado final.

Cuantificación de IgG y/o albúmina en LCR

- Se realiza igual que el acápite anterior (cuantificación de inmunoglobulinas por IDR) sólo que con placas de baja cuantificación (Berhing LC-Partigen). Estas placas tienen una concentración más baja de antisuero y sus hoyuelos tienen una capacidad de 20 μ L en lugar de los 5 μ L habituales.

Detección anticuerpos antitiroglobulina por hemaglutinación pasiva con cloruro de cromo

Materiales	Reactivos y soluciones
-Placas plásticas de 96 huecos, de fondo en U -Tubos de cristal -Pipetas	<ul style="list-style-type: none"> • Eritrocitos humanos Grupo O (10 mL con 1 mL de citrato de sodio 3,8 %) • Tiroglobulina humana 200 μg/mL • Sol. salina (8,5 g NaCl/L de H₂O destilada) • Soluciones de cloruro de cromo: <ul style="list-style-type: none"> .Sol. stock (0,125 g Cl₃Cr.6H₂O en 10 mL de salina) .Solución de lavado (0,1mL sol. stock en 100mL salina) .Solución de recubrimiento 0,1 % (0,8 mL de sol. stock en 9,2 mL de salina) .NRS (suero normal de conejo inactivado a 56°C, diluido 1:1 000 en salina) .Suero de pacientes y controles positivo y negativo diluidos 1:5 en NRS)

Metodología

- Lavar los eritrocitos humanos 3 veces con la solución de lavado
- Mezclar en un tubo de cristal de centrifuga 0.2 mL del paquete de eritrocitos lavados, 0.2 mL de solución de recubrimiento y 0.2 de tiroglobulina diluida (o NRS 1:200 para las células control) e incubar durante 4 min a temperatura ambiente.

- Adicionar 10 mL salina para detener la reacción y centrifugar.
- Lavar 2 veces con NRS 1:100
- Resuspender el paquete de eritrocitos en 19.8 mL de NRS para obtener una solución 1 %.
- En una placa de 96 huecos de fondo en U, añadir 0.025 mL de NRS 1:100 del pozo 1-12.
- Añadir 0.025 mL del suero test diluido 1:5 NRS y transferir hasta el pozo 9.
- Añadir 0.025 mL del suero test en el pozo 11 y transferir al pozo 12.
- Repetir con todos los sueros test y los controles positivo y negativo.
- Adicione 0.025 mL de la suspensión de eritrocitos recubiertos con tiroglobulina del pozo 1-10 y 0.025 mL de la suspensión de las células sin recubrir (células control) del pozo 11-12.
- Mueva fuertemente la placa para mezclar.
- Incube la placa tapada a la temperatura ambiente durante 1 hora y a 4°C durante toda la noche.
- Lectura de la placa: los casos positivos se observan como una fuerte aglutinación que se presenta como una suave superficie lisa por encima del fondo del pozo, los casos negativos se observan como un botón de células bien definido en el fondo del pozo.

Crioglobulinas

Principio

- Algunas inmunoglobulinas pueden precipitar a temperaturas por debajo de 37°C.

Procedimiento

- Tomar la muestra con material a 37°C. La sangre se deja coagular en incubadora a 37°C. Se centrifuga a 37°C (puede utilizarse camiseta de agua a 40°C en centrifugas no regulables) o decantar el suero directamente de la incubadora sin centrifugación.
- El suero se guarda a 4°C y se observa diariamente la precipitación desde las 24 a 72 horas.
- Si aparece crioprecipitado se centrifuga a 4°C, se decanta, se lava con solución fosfato pH 4,0 tres veces a 37°C con centrifugaciones a 4°C.
- Se caracteriza el precipitado mediante IDR simple en placas de baja cuantificación.
- Si se trata de una paraproteína, los lavados pueden hacerse en salina fisiológica.

Nota: Si no se pretende caracterizar el precipitado, el resultado se informa como positivo o negativo y puede comprobarse si se redissuelve el precipitado a 37°C.

Congelación de linfocitos

Fundamento

- Se basa en la utilización del dimetilsulfóxido (DMSO) como preservante de la membrana linfocitaria del daño provocado por la congelación-descongelación celular a temperaturas muy bajas y tiempos prolongados.

Equipos, reactivos y materiales

<i>Materiales</i>	<i>Reactivos</i>	<i>Equipos</i>
-Pipetas Pasteur -Tubos de centrifuga	-Dimetilsulfóxido (DMSO) -Medio de cultivo (M199, RPMI, MEM, etc.) -Suero AB o bovino fetal -Colorante azul tripan	-Congelador (-80°C) -Refrigerador doméstico -Baño María c/agitación -Termos de nitrógeno líquido de boca ancha -Centrífuga

Procedimiento

- Separación de linfocitos con gradiente de Ficoll-Paque
- Resuspender en medio de cultivo +20 % suero AB a una concentración linfocitaria entre 10-50 millones/mL.
- Preparar una solución de DMSO 20 % en medio de cultivo suplementado con suero AB o suero bovino fetal.
- Agregar la solución de DMSO a 4°C en proporción 1:1 lentamente a la suspensión de linfocitos.
- Fraccionar en criotubos de 2 mL no más de un mL de la suspensión.
- Rápidamente congelar a -80°C y a las 24 horas pasar los criotubos al nitrógeno líquido (-118°C) si se desea mantener por más de 2 meses.
- Descongelar rápido con agitación en baño de María (esta operación debe durar de 30 a 50 segundos).
- Rápidamente diluirlo en medio de cultivo a 37°C.
- Realizar 3 lavados de dos minutos a temperatura ambiente con medio enriquecido con suero bovino fetal o AB.
- Ver viabilidad con tripan azul.

Adherencia leucocitaria

Fundamento

- Se utiliza la adherencia de los PMNs a la fibra de nylon para evaluar la adherencia leucocitaria al endotelio vascular.

Procedimiento

- Extracción de 5 mL de sangre heparinizada.
- Colocar por cada caso 3 tubos cada uno con 3 jeringuillas de insulina con 50 mg de fibra de nylon (sin previa preparación) con su aguja. Cerciorarse que la aguja no esté tupida. Precalentar la gradilla con los tubos y las jeringuillas a 37°C durante 10 min.
- Se agrega 1 mL de sangre heparinizada a cada jeringuilla y se lleva a la incubadora a 37°C durante 10 min. Cerciorarse antes que esté filtrando, que no haya agujas tupidas. Si hay alguna tupida puede ayudarse poniéndole el embolo y oprimiendo.
- Se extienden 2 láminas por cada filtrado y 2 de la sangre no filtrada.

○ Por cada caso: tubo con sangre no filtrada

- ✧ filtrado A 4 tubos y 8 láminas
- ✧ filtrado B
- ✧ filtrado C
- ✧ Teñir las láminas con May Grünwald - Giemsa.
- ✧ Interpretación, por ejemplo:

	conteo leuco	gran.	linf.	eo.	bas.	mono.	abs.gr.	% adh
1-A	6 000	60	35	03	-	02		100
1-1	2 500	10	89	01	-	-	250	93
1-2	3 000	8	88	02	-	02	240	93.3
1-3	2 800	12	82	04	-	04	336	90.6

media del % adh 92

VR: 89 ± 5 %

Anticuerpos antiplaquetarios

Muestras

Pacientes: ♦ 5-10 mL de sangre en tubo con EDTA (si trombocitopenia se extrae más de 10 mL).

♦ 5 mL de sangre sin anticoagulante para suero

Controles: ♦ 5-10 mL de sangre de donante grupo **O** en tubo con EDTA y 1 mL de suero de donante de banco grupo **AB**.

Reactivos

- Antisuero anti inmunoglobulinas humanas (puede ser polivalente o anti-IgG) marcado con FITC. Ajustar la concentración de trabajo.

PBS – BSA – EDTA pH= 6.8

Na₂HPO₄.....0.1M.....7 mL

KH₂PO₄.....0.1M.....1 mL

EDTA disódico..... 10 %.....1 mL

BSA.....22-30 %.....1.5 mL

NaCl.....0.85 %.....89.5 %

Glicerol - PBS 1/8 (Medio de montaje)

Solución de paraformaldehído (solución madre)

✧ Solución stock:

Paraformaldehído..... 4 g (diluir 70°C baño María)

NaCl al 0.85%.....90 mL

NaOH (1M?)..... gotas

-Reajustar pH con HCl hasta 6.8 – 7.0

-Conservar a 4 °C fuera de la iluminación (oscuro).

-Solución de trabajo 1 % en PBS pH 7.2

-Almacenar a 4°C durante 1 semana

Método de aislamiento de las plaquetas

- Centrifugar las muestras de sangre durante 10 min. a 500 x g a TA para transferir el plasma rico en plaquetas a tubos de ensayo plásticos,
- En tubos de 12 x 75 colocar 1.5 mL de plasma rico en plaquetas y adicionar 1.5 mL de la solución PBS-BSA-EDTA y centrifugar a 1300 x g 4 min. a TA.
- Eliminar el sobrenadante y añadir al *pellet* 1 mL de solución de trabajo de paraformaldehído 1 % e incubar 5 min. a TA.
- Añadir 1 mL de PBS-BSA-EDTA a las plaquetas tratadas con paraformaldehído y centrifugar 1300 x g durante 3 min.
- Lavar las plaquetas dos veces con 2 mL de PBS-BSA-EDTA cada vez a 2 000 rpm durante 3 min.
- Se hace una mezcla de todas las plaquetas aisladas y se resuspenden en PBS-BSA-EDTA y se ajustan a 2×10^8 /mL.

Test directo de IF

- Dilución apropiada de anti Ig marcada con fluoresceína diluida en PBS-BSA-EDTA (pH 7)

- Incubar 100 µL de suspensión de plaquetas más 100 µL de anti-Tg durante 30 min a TA en tubos de cristal.
- Lavar muestras 2 veces c/2 mL de PBS-BSA-EDTA por 5 min a 100xg.
- Resuspender los *pellet* en 0.1 mL de glicerol PBS pH-7 y se mantienen en lugar oscuro a 4°C hasta que se examine la muestra al microscopio.

Test indirecto de IF

- Plaquetas aisladas de controles y pacientes tratadas con paraformaldehído y lavadas como de describió anteriormente.
- Incubar 100 µL de la suspensión de plaquetas más 100 µL del suero de pacientes y controles a 37°C, mezclado periódicamente.
- Lavar las plaquetas 4 veces con PBS-BSA-EDTA a 4°C con 2 mL de solución de lavado a 100 x g.
- Seguir las instrucciones de la IF directa.

Interpretación

Positivo Anillos fluorescentes continuos (Ag de membrana)

Negativo Puede aparecer fluorescencia homogénea pero no se distingue la membrana

Método de inmunofluorescencia indirecta para pesquiasaje de los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA)

Materiales	Reactivos	Equipos
-Láminas portaobjeto con extensiones de sangre periférica humana sin importar grupo sanguíneo	-Antisero anti-Igs humanas conjugadas con FITC -PBS: NaCl34.00 g Na ₂ HPO ₄5.12 g NaH ₂ PO ₄ .2H ₂ O.....0.624 g H ₂ O bidestilada.....4 L <i>Ajustar Ph: 7.2 – 7.4</i>	-Microscopio fluorescente con epi iluminación

Principio

- Las extensiones de sangre periférica humana contienen células neutrofilicas que son el sustrato para determinar la presencia de los anticuerpos anticitoplasma del neutrófilo (ANCA). La unión de estos anticuerpos a distintos componentes del citoplasma del neutrófilo se evidencia con la consiguiente incubación con el antisero anti-Igs humanas conjugadas con FITC, reacción que se visualiza con el examen de las muestras en el microscopio de fluorescencia.

Metodología

- Se recogen 2 mL de sangre venosa periférica de un individuo sano sin considerar grupo ABO ni tipo Rh en vial con EDTA.
- La muestra se centrifuga a 1500 x g a TA durante 6 minutos
- Se elimina 90 % del plasma y se reconstituye con la misma cantidad de PBS
- La muestra se resuspende gentilmente y se realizan las extensiones sobre láminas portaobjeto.
- Las láminas se dejan secar a t ambiente durante 5 minutos.
- Se fijan el etanol 100 % a -20°C durante 5 minutos.
- Las láminas se secan con aire de ventilador durante 10 minutos y se colocan en cámara húmeda.
- Se marcan círculos en el área mas fina de la extensión para colocar las muestras problema.
- Las muestras problema y los controles se diluyen en PBS 1:10 y se colocan aproximadamente 50 µL de la dilución sobre el área circular de la extensión.
- Las láminas se incuban en cámara húmeda a TA durante 15 minutos.
- Las láminas se lavan con 5 recambios de PBS, 7 minutos cada vez.
- Se agrega sobre las áreas circulares de las extensiones el antisuero conjugado a la dilución de trabajo (podría ser 1:200, si es el poliespecífico de la Sigma) y se deja incubar en cámara húmeda a TA durante 15 minutos
- Las láminas se lavan nuevamente con 2 recambios de PBS
- Las láminas se examinan en el microscopio de inmunofluorescencia.
- Los resultados se interpretan como negativos cuando la intensidad de fluorescencia de los neutrófilos y monocitos de la muestra problema es igual o menor que la del suero control negativo; o como positivos cuando se observa una fluorescencia citoplásmatica o perinuclear selectiva de los neutrófilos y monocitos, a diferencia de los linfocitos.