



INSTRUCTIVO DE INMUNODIFUSIÓN RADIAL DOBLE (IDR)

1. Materiales necesarios.

A- Reactivos.

1. Agar purificado Noble DIFCO o Bacto Agar BD (cat. 214010).
2. Cloruro de sodio.
3. Citrato de sodio.
4. Coomassie blue R-250.
5. Metanol.
6. Ácido acético.
7. Solución de fenol 0,3%.
8. Glicina.
9. Alcohol - acetona (70:30).
10. Agarosa electroendosmosis (EEO).
11. Agua destilada.
12. Antígeno de referencia del hongo a ensayar.
13. Antisuero control positivo de referencia del hongo a ensayar.
14. Muestra a ensayar.

B- Equipos.

1. Portaobjeto de 25 x 76 mm.



2. Cortador de gel de agar con esquema de siete hoyos o perforador metálico/plástico de 4 mm de diámetro.
3. Aguja o instrumento con punta para retirar los cilindros de gel sin romper las paredes.
4. Pipeta automática P20.
5. Tips P20.
6. Pipeta graduada de 10 ml o 5 ml.
7. Propipeta.
8. Cámara húmeda.
9. Heladera 2-8°C.
10. Estufa o cámara de 25-28°C.
11. Horno microondas o baño maría (mechero con recipiente para calentar agua).
12. Pincel plano #8 o similar.
13. Recipiente plástico tipo cubeta.
14. Papel de filtro (Whatman # 1).
15. Estufa 37-50 °C.
16. Marcador indeleble.

2. Preparación de reactivos.

A- Precubierta de agarosa al 1% en agua destilada.

Disolver 250 mg de agarosa EEO en 25 ml de agua destilada calentando a baño maría hasta fusión completa, sin sobrecalentar. Colocar los portaobjetos previamente desengrasados con alcohol-acetona en una bandeja y realizar una marca, en una de las esquinas del vidrio con marcador indeleble, que permita identificar la cara con precubierta. Con un pincel distribuir



uniformemente la agarosa aún fundida sobre la cara expuesta de las láminas portaobjetos. Colocar la bandeja con los vidrios a 25-37°C protegidas del polvo y la humedad. Luego de 24 h guardar las láminas en una caja y almacenar en lugar seco hasta su uso.

B- Agar fenolizado 1% pH= 6,3-6,4.

Cloruro de sodio	0,9 g
Citrato de sodio	0,5 g
Fenol 0,3 %	0,25 ml
Glicina	7,5 g
Agar purificado o Bacto Agar	1,0 g
Agua destilada csp	100 ml

Colocar 50 ml de agua destilada en un Erlenmeyer de 250 ml con tapón. Agregar 0,9 g de cloruro de sodio y 0,5 g de citrato de sodio. Disolver completamente ambas sales. Agregar 0,25 ml de fenol y 7,5 g de glicina. Mezclar bien. Agregar 1,0 g de agar purificado o bacto agar y llevar a 100ml con agua destilada. Calentar a baño maría hasta que se funda el agar. **NO SOBRECALENTAR. NO AUTOCLAVAR.** El pH final del agar-fenolizado debe ser 6,3-6,4. Fraccionar en tubos de tapa a rosca (cierre hermético, limpios y estériles, a razón de 10 ml por tubo). Se puede almacenar entre 2 y 8 °C, evitando la deshidratación, en caso de observar deshidratación descartar.

C- Solución decolorante.

Metanol	500 ml
---------	--------



Ácido acético	200 ml
Agua destilada	300 ml

D- Solución colorante de coomassie blue R-250.

Coomassie blue R-250	0,30 g
Solución decolorante	100 ml

E- Solución fisiológica.

Cloruro de sodio	8,5 g
Agua destilada csp	1000 ml

F- Solución citratada.

Cloruro de sodio	8,5 g
Citrato de sodio	50g
Agua destilada csp	1000 ml

3. Preparación de las láminas para la IDR.

1. Fundir el agar fenolizado a baño maría o en microondas a máxima potencia hasta observar el agar en fase líquida, sin que llegue a ebullición, dejar enfriar a 60°C-65°C.
2. Colocar los portaobjetos con la precubierta hacia arriba sobre una superficie plana y nivelada y rotular con marcador indeleble. Dispensar sobre el mismo 3 ml de agar fundido



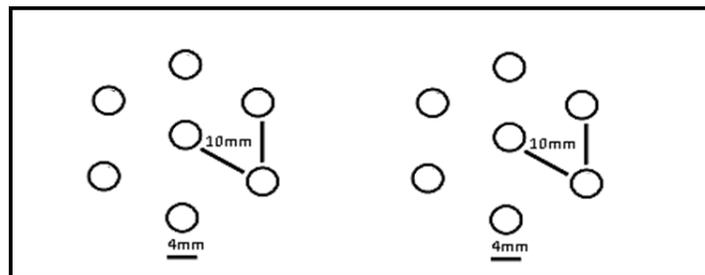
con una pipeta de 5 o 10 ml. Esta cantidad fue calculada para que el espesor de la capa de agar oscile entre 1,2 a 1,6 mm. Si el gel es demasiado delgado las líneas son tenues y confusas y si es muy grueso (2 mm o más) el número de bandas inespecíficas o dudosas aumenta porque no se puede disolver en los lavados.

3. Dejar solidificar sin mover la lámina y si es necesario (depende de la temperatura ambiente), colocar en heladera por lo menos una hora antes de hacer los pocillos. Estas láminas se pueden conservar hasta 48 h en la heladera en cámara húmeda, siempre que no estén deshidratadas.

4. Ejecución de la prueba.

1. Sacar las láminas de la heladera.
2. Cortar el gel con la matriz de 7 pocillos o con los perforadores de 4 mm de diámetro. Es conveniente realizar la plantilla con el esquema de perforación sobre un papel milimetrado y plastificarlo. Las distancias entre pocillos deben ser de 10 mm con un esquema como se muestra en la Figura 1.

Figura 1. Esquema de perforación





3. Retirar los cilindros de gel con una aguja sin dañar las paredes porque provoca una difusión desigual y las bandas adquieren formas caprichosas y difíciles de interpretar.
4. Identificar cuidadosamente la posición de las muestras y la ubicación de suero/s y antígeno/s a probar en el esquema.
5. Con pipeta automática llenar los pocillos con 20 μL de suero y/o antígeno según corresponda. Es importante NO SOBRELLENAR los pocillos y tampoco desbordarlos.
6. Revisar que no queden burbujas de aire, si las hay, deben eliminarse con un palillo de madera o tip, cuidando de usar uno diferente para cada muestra.
7. Colocar la placa en cámara húmeda, sobre una superficie nivelada, en estufa entre 25 y 28°C durante 72 h.
8. Luego de transcurridas las 72h, cubrir la lámina de inmunodifusión con solución citratada en un recipiente plástico tipo cubeta durante 90 min para disolver bandas inespecíficas.
9. Retirar la solución citratada y realizar por lo menos 3 lavados de 2 h cada uno con solución fisiológica.
10. Retirar la solución fisiológica y sumergir las láminas en agua destilada durante 10 min.
11. Retirar el agua de la cubeta, dejando los pocillos de la lámina hidratados.
12. Cubrir la lámina con papel de filtro (Whatman # 1) humedecido en agua destilada.
13. Colocar las láminas en una bandeja y secar en estufa entre 37 y 50 °C durante una noche (las láminas pueden quedar durante un fin de semana en la estufa).
14. Sumergir la lámina seca en un recipiente con agua destilada durante 5 min para humedecer el papel de filtro y retirar el mismo cuidadosamente.
15. Sumergir en solución colorante durante 10 min.
16. Sumergir en solución decolorante hasta buena visualización de las bandas (color azul).



17. Lavar con agua destilada, secar a temperatura ambiente y guardar las láminas.

5. Validez de la prueba

Para que la prueba sea válida debe observarse banda de precipitación entre el antígeno y el antisuero control positivo.

6. Documentos complementarios

Video instructivo de inmunodifusión: <https://www.youtube.com/watch?v=I3b7Cnmv2pY>