



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA III SEMESTRE

Jorge Luis Gutiérrez Cuesta

Bacteriólogo Especialista en Laboratorio Clínico
de Hematología y Banco de Sangre

Facultad de Ciencias de la Salud
Programa de Bacteriología





© **Corporación Universitaria Rafael Núñez**
Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
2018
Hecho en Colombia

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología

Rosana de la Torre Barboza

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Elayne Flórez Julio

Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo

Zarina Durango Herazo

Autor

José Luís Gutiérrez Cuesta



TABLA DE CONTENIDO

Presentación.....	5
Normas generales de Bioseguridad en el Laboratorio.....	6
Plan de Trabajo del estudiante.....	7
Materiales para todas las clases.....	8
Generalidades de la respuesta inmunitaria.....	9
Inmunoensayos.....	10
Hematopoyesis y Órganos linfoides.....	12
Práctica N°1: Hemoclasificación.....	13
Práctica N° 2: Gravindex o prueba de embarazo.....	21
Práctica N°3: Determinación de C4 (turbidimetría).....	23
Inflamación.....	24
Práctica N° 4: Proteína C reactiva (PCR).....	25
Práctica N° 5: Monotest.....	27
Práctica N° 6: prueba de TORCH.....	28
Inmunidad Adaptativa.....	31
Práctica N° 7: Antígenos febriles.....	31
Práctica N° 8: VDRL-RPR.....	33
Práctica N° 9: Cuantificación de inmunoglobulinas.....	35
Práctica N° 10: Cuantificación de hormonas (LH-FSH).....	37
Respuesta Inmune contra agente infecciosos.....	39
Práctica N° 11: ASTO.....	39
Práctica N° 12: Dengue.....	41
Práctica N° 13: β - HCG (quimioluminiscencia).....	43



Práctica N° 14: VIH (Enzimoinmunoensayo).....	45
Autoanticuerpos (Inmunofluorescencia Indirecta –Aglutinación).....	46
Práctica N° 15: ANA´s (IFI).....	48
Práctica N° 16: Factor reumatoideo- RA Test- RF.....	49
Bibliografía	



PRESENTACIÓN

El campo de la inmunología ha progresado rápidamente en los últimos años, y los avances se han dado no solamente en el campo de la inmunología básica, sino también en el campo del diagnóstico.

En la actualidad están disponibles una gama de pruebas de laboratorio para analizar, de manera simple, cualquier componente del organismo. La mayor parte de los análisis ha emergido de las aplicaciones en la investigación de la inmunología básica. La definición del enfoque práctico de las pruebas de laboratorio clínico inmunológico para su competencia, requiere establecer dos características claves: 1) la sensibilidad y especificidad y 2) precisión técnica del procedimiento de prueba.

Independientemente de la metodología empleada, las pruebas inmunológicas de laboratorio tienen como fundamento principal la reacción **antígeno-anticuerpo**, reacción que puede producirse tanto in vivo como in vitro.

La reacción antígeno-anticuerpo puede demostrarse de muchas maneras, entre las cuales se encuentran las siguientes:

- Aglutinación.
- Hemólisis.
- Inhibición.
- Absorción.
- Precipitación.
- Fijación de complemento.
- Radioinmunoensayo.
- Fluorescencia.
- Inmunoensayo enzimático.
- Microscopia inmunoelectrónica.

Los métodos inmunológicos descritos en este manual fueron elegidos teniendo en cuenta su utilidad en los laboratorios de diagnóstico clínico, lugar en donde un alto porcentaje de los egresados se desempeñaran profesionalmente.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO DE HEMATOLOGÍA ESPECIAL

1. El alumno deberá ingresar al laboratorio con equipo de seguridad: Bata blanca hasta la rodilla y de manga larga. Tapabocas y gorro.
2. Para tener derecho a ingresar al laboratorio, el alumno debe tener claro los fundamentos de la práctica a realizar, elementos y muestras biológicas solicitadas para la práctica. Reporte de la práctica anterior. El laboratorio inicia puntualmente, no se permitirá el ingreso tarde bajo ninguna excusa.
3. En el laboratorio está prohibido el ingreso de los siguientes elementos: Teléfonos celulares, localizadores, reproductores de música, cámaras o cualquier otro artefacto electrónico (iPod, iPad, Laptops, tablets etc.) que pueda interferir con la atención del estudiante. Comida y bebidas. Gorras, mochilas, bolsos u otro accesorio que no sea requerido por el docente. Todas las pertenencias deberá dejarlas en los casilleros asignados.
4. No puede trabajar en el laboratorio si tiene uñas acrílicas y joyería.
5. Las personas con cabello largo deben recogerlo con una cola o gancho y usar gorro.
6. El alumno es responsable del material que recibe, manteniéndolo limpio y en perfecto estado a lo largo de cada práctica. Deberá realizar una requisición del material antes de iniciar la práctica y al finalizar será revisado por las auxiliares a cargo.
7. En caso de que el estudiante dañe parcial o totalmente un material, deberá comprometerse a reponer el material y debe quedar constancia ante coordinación del CEID. Los alumnos serán responsables de dejar los reactivos cerrados y sin



contaminar por otros, las mesas limpias y en orden, lo mismo que el equipo que sea utilizado durante la práctica.

8. Es necesario que cualquier persona que se encuentre dentro de las instalaciones del laboratorio se comporte de forma adecuada, cumpliendo con el reglamento y las normas de seguridad requeridas

PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

1. Previamente a la práctica, lea los procedimientos que se van a realizar y prepare todos los aspectos teóricos correspondientes, y los materiales y/o muestras necesarias para la ejecución de la misma.
2. Anote cuidadosamente sus resultados: el examen de la práctica, no solo se limitará a la información proporcionada por el manual o el docente sino también de sus propias observaciones, investigación y deducciones.
3. Asegúrese que la superficie del mesón esté limpia y seca antes de comenzar la práctica.
4. En la mesa de trabajo solo debe estar el material necesario para la realización de la práctica. Debe estar limpio y ordenado.
5. Asegúrese de marcar adecuadamente las láminas de los frotis de sangre periférica.
6. Practique varias veces el procedimiento y en caso de dudas preguntar a su docente.
7. Anote y/o dibuje todo los fenómenos observados y los resultados obtenidos para una mejor realización del informe de laboratorio.
8. Al terminar limpie la zona de trabajo descartando el material que no necesite. Descarte los materiales usados en los sitios destinados para esto. No deje material contaminado en las mesas de trabajo al finalizar la práctica.
9. Siempre utilice todas las normas de bioseguridad.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

1. Marcador cristalográfico.
2. Guantes desechables.
3. Mascarilla o tapabocas.
4. Gafas de protección.
5. Toalla pequeña.
6. Muestra solicitada.
7. Papel absorbente
8. Guías de laboratorio previamente estudiadas.
9. Conclusión personal y desarrollo de talleres.

INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS



GENERALIDADES DE LAS RESPUESTAS INMUNITARIAS

CONCEPTOS TEÓRICOS DE INMUNOENSAYOS (CLASE TEÓRICA)

INTRODUCCIÓN

Es de suma importancia que dentro del proceso enseñanza aprendizaje, al iniciar una asignatura, el profesor de a conocer a los estudiantes los contenidos y estrategias diseñados para el semestre, así, estos los pueden analizar y dar su opinión, con el fin de que el docente realice ajustes al programa teniendo en cuenta las características propias del grupo al que va a acompañar.

Por esto, se expondrá a los estudiantes la dinámica que se desarrollará en las clases, los contenidos y didácticas semanales y, la evaluación que se efectuará durante el transcurso de todo el semestre. Así mismo, propiciará la interrelación entre estudiantes y con el docente.

Posteriormente, se hará una disertación sobre sistema inmune y sus principales componentes, así mismo, el concepto de inmunoensayo, clases de inmunoensayo; los tipos de anticuerpos (Acs) y antígenos (Ags) utilizados en la fabricación de estos y distintas clases de inmunoanálisis.

OBJETIVO GENERAL

- Analizar los componentes del programa de Laboratorio de Inmunología.
- Comprender los principios de las diferentes clases de inmunoensayos o inmunoanálisis.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Propiciar la interrelación entre los alumnos y docente.
- Analizar la didáctica semestral y el manejo de este manual.
- Conceptualizar acerca de los diversos tipos de inmunoensayos.



INMUNOENSAYOS

El Inmunoensayo es un método analítico basado en la interacción específica entre antígeno (Ag) y anticuerpo (Ac). Se utilizan en muchos campos, área clínica, ambiental, alimentaria, agronómica, entre otras. Hay muchos formatos, buscando diferentes características de funcionamiento y de acuerdo a características compartidas, hay una diversidad de clases:

- Cualitativo, cuantitativo.
- Competitivo, No competitivo o inmunométrico.
- Homogéneos, heterogéneos.
- Con marca, sin marca.

Los inmunoensayos son elaborados por las casas comerciales con antígenos nativos, sintéticos o recombinantes y con anticuerpos monoclonales o policlonales. Dependiendo del tipo de Ag o Ac puede variar la sensibilidad o especificidad de la prueba.

MÉTODOS INMUNOLÓGICOS

Los métodos inmunológicos o inmunoensayos son métodos analíticos basados en la reacción Antígeno-Anticuerpo (Ag-Ac). Se entiende como antígeno (Ag) cualquier molécula que puede ser reconocida específicamente por cualquiera de los componentes sistema inmunitario (SI) que protege al organismo de una amplia variedad de agentes infecciosos. En un sentido más restrictivo un Ag es cualquier molécula capaz de inducir la producción de anticuerpos (Ac) específicos.

Los anticuerpos (Ac), también conocidos como inmunoglobulinas, son un grupo de moléculas séricas que producen los linfocitos B. Los diferentes tipos de Ac tienen una estructura básica común a todos ellos, siendo específico de cada uno el sitio por el que se unen al Ag. La zona de la molécula del Ag a la que se une el Ac se denomina epítipo. Un antígeno puede presentar un número variable de epítipos de estructura única o repetitiva.



La complejidad estructural de las proteínas favorece que éstas presenten por lo general un número elevado de epítomos. Los reactivos para anticuerpo se desarrollan a partir de anticuerpos policlonales y monoclonales. Los inmunoensayos se pueden clasificar en:

- 1) Inmunoensayos Directos. Medida directa del complejo Ag-Ac.
- 2) Inmunoensayos con Reactivos Marcados o Indirectos. Requieren el uso de material marcado para medir la concentración de antígeno o anticuerpo presente. Estos a su vez se clasifican:

A) Según el TIPO DE MARCADOR

Radioinmunoensayos: La reacción Ag-Ac se pone de manifiesto por la competición entre el Antígeno o el Anticuerpo que estemos estudiando y una concentración conocida del mismo compuesto marcado radiactivamente.

Fluoroinmunoensayos: Para la realización de estas técnicas el anticuerpo se marca con un fluorocromo detectándose la formación del complejo Ag-Ac por la fluorescencia emitida.

Enzimoinmunoensayos: Utilizan una enzima como marcador para amplificar la señal obtenida de la reacción entre un antígeno y un anticuerpo. Dentro de los enzimoinmunoensayos hay que destacar los Quimioinmunoensayos, en los cuales la enzima cataliza la oxidación de un sustrato.

B) Según el MÉTODO DE SEPARACIÓN

Heterogéneos. El Ag marcado unido al Ac (Ac-Ag*) debe de ser físicamente separado del Ag marcado que permanece libre en la disolución (Ag*). El procedimiento de separación puede llevarse a cabo por precipitación de los Ac o por la adición de un segundo Ac que atrapa y precipita el Ac original.

Homogéneos. No requieren la separación de la unión anti Ac-Ag* del Ag* libre.

C) Según el DISEÑO DEL ENSAYO

Competitivos. En los formatos competitivos, el analito sin marcar (generalmente antígeno) en la muestra se mide por su capacidad para competir con un antígeno marcado en el inmunoensayo. El antígeno sin marcar bloquea la capacidad del antígeno marcado de unirse puesto que ese punto de unión en el anticuerpo ya se encuentra ocupado. En el formato competitivo de un solo paso tanto el reactivo del antígeno marcado (Ag*) como la muestra sin marcar (o analito de la muestra)



compiten por una cantidad limitada de anticuerpo. La concentración de antígeno es inversamente proporcional a la concentración de la señal.

No competitivos o “sandwich”. El analito está unido (como un sandwich) entre dos reactivos de anticuerpo muy específicos. En los ensayos no competitivos, la medición del analito marcado, generalmente un anticuerpo, es directamente proporcional a la concentración de antígeno presente en la muestra, lo que puede representarse por medio de una curva de respuesta a la concentración.

HEMATOPOYESIS Y ÓRGANOS LINFOIDES

SISTEMAS ABO Y RH (AGLUTINACIÓN), PRUEBA DE EMBARAZO (INMUNOCROMATOGRAFÍA)

I. INTRODUCCIÓN

El método de aglutinación es uno de los más utilizados en el área de inmunología de los laboratorios clínicos dentro de las denominadas pruebas de rutina. Por otra parte, la inmunocromatografía es uno de los métodos de inmunodiagnóstico más contemporáneo cuyas principales ventajas son la sencillez y rapidez del test. Cada vez son más las aplicaciones de esta técnica en diferentes campos, debido a que no son necesarios reactivos ni instrumentación adicional. Por eso es importante que los futuros profesionales de la Bacteriología adquieran competencias, destrezas y habilidades en la utilización de estos dos métodos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender el fundamento del método de aglutinación y de inmunocromatografía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar mediante aglutinación el grupo sanguíneo en los sistemas ABO y Rh.



- Analizar el principio de la inmunocromatografía.
- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de los métodos.
- Comprender la aplicabilidad clínica de las pruebas.

PRÁCTICA N°1. HEMOCLASIFICACIÓN (SISTEMA ABO Y SISTEMA Rh)

I. INTRODUCCIÓN.

Los antígenos de los sistemas ABO y Rh presentes en la superficie de los eritrocitos reaccionan con su antisuero específico formando un aglomerado de antígenos unidos a anticuerpos que puede ser evidenciado por una hemoaglutinación.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Facilitar a los estudiantes desde lo cognitivo y lo procedimental la identificación en el Laboratorio de los sistemas ABO y sistema Rh en el humano, siendo estos los de mayor importancia en inmunohematología.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Valorar la importancia del sistema ABO y sistema Rh para la medicina transfusional.
- Explicar los principios teóricos de las técnicas empleadas en la identificación de los grupos sanguíneos.
- Realizar correctamente la prueba según protocolo establecido.

III. MÉTODO: hematoaglutinación

IV. FUNDAMENTO

En la hemoclasificación se identifica el grupo sanguíneo al que pertenece una persona. Los grupos sanguíneos son antígenos localizados en la superficie de los eritrocitos o glóbulos rojos que pertenecen a variados sistemas. Cada sistema de



antígeno o grupo sanguíneo tiene miembros, y cada miembro puede estar compuesto de uno a más antígenos distintos. Algunos sistemas son de mayor interés clínico que otros. Desde el punto de vista de la respuesta inmune, los más importantes son los sistemas ABO y Rh por las reacciones adversas o de rechazo durante una transfusión sanguínea.

V. REACTIVOS Y MATERIALES:

Algodón, alcohol, lancetas, lámina de hemoclasificación (transparente), palillos, Reactivo anti-A, reactivo anti-B, reactivo anti-D.

VI. MUESTRA: sangre total.

VII. PROCEDIMIENTO:

- Masajear la yema del dedo.
- Realizar asepsia con algodón y alcohol.
- Hacer la punción en la yema del dedo con la lanceta.
- Colocar tres gotas de sangre separadamente en la lámina.
- Agregar a una gota de sangre una gota reactivo anti-A, a la segunda una gota de reactivo anti-B y a la última una gota de reactivo anti-D.
- Mezclar con palillos diferentes y rotar la lámina.
- Observar presencia o ausencia de aglutinación (grumos) hasta 2 minutos.

ANTÍGENOS DE LOS GRUPOS SANGUÍNEOS.

Los antígenos con que iniciamos nuestro recorrido por los inmunoensayos, están ubicados en los eritrocitos humanos, los cuales son responsables del color rojo de la sangre, la cual es un tejido líquido constituido por unos elementos formes llamados células, las cuales se encuentran suspendidas en un líquido amarillo llamado plasma; **las células son de tres clases: eritrocitos, leucocitos y las plaquetas.**

La membrana del eritrocito está formada por varias moléculas, algunas de naturaleza proteica, otras son carbohidratos; cada una de estas moléculas



representan un **epitope**, es decir una porción de toda la molécula de antígeno (para este caso el eritrocito) capaz de unirse al anticuerpo que aparece como producto de su estimulación al sistema inmunitario.

Los epitopes o antígenos del sistema ABO.

Los inmunogenos del sistema ABO son carbohidratos cuya especificidad reside en los azúcares terminales de un oligosacárido ubicado sobre una proteína en la membrana del eritrocito. El control genético ocurre a través de la producción de enzimas transferasas que conjugan los azúcares terminales a un carbohidrato original, me explico en el aspecto bioquímico, una persona del grupo O carece de galactosiltransferasas necesarias para formar el antígeno B y también carecen de la galactosilaminotransferasa necesaria para formar el antígeno A. Las personas del grupo AB tienen ambas enzimas; las personas del grupo A o B tienen su correspondiente transferasa. Los antígenos surgen de una sustancia precursora o sustancia H que presenta una fucosa unida al final de la D-galactosa por una unión alfa-1,2-glucosídica. La N-acetilgalactosamina es la que le proporciona la actividad al antígeno A; la galactosa es la que determina la actividad del antígeno B.

Los grupos sanguíneos y el sistema ABO fueron descubiertos por **Landsteiner** en 1900, cuando observó que los eritrocitos de algunos individuos se aglutinaban cuando se mezclaban con el suero de otro, pero no con su propio suero. Sin embargo cabe anotar que algunos autores señalan que fue Erlich y sus colaboradores los que por primera vez demostraron la existencia de antígenos en la superficie del glóbulo rojo. Mediante la aglutinación Landsteiner logró establecer cuatro tipos de eritrocitos: A, B, AB, y O. Los grupos A y B presentan subgrupos: del A se han descrito 11 y los más frecuentes son el A1 (78%) y A2 (22%). Son hasta la fecha el sistema más importante a tener en cuenta en las transfusiones de sangre.

ANTICUERPOS NATURALES.

Son los anticuerpos que aparecen en el torrente sanguíneo, en ausencia de un estímulo antigénico conocido. Se les llama así a los anticuerpos que acompañan en forma espontánea al sistema ABO. Se cree que estos se forman por estímulo de sustancias muy comunes tales como bacterias intestinales, virus y alimentos, ya que se ha observado similitud química entre estas y los eritrocitos del grupo A y B. Estos anticuerpos pertenecen principalmente a la clase IgM (pueden existir de la clase IgG, e IgA) reaccionan mejor con el eritrocito a una temperatura de 4°C a 25°C. Se les conoce funcionalmente como anticuerpos completos porque presentan actividad aglutinante en solución salina y activan complemento para causar



hemólisis; se les conoce también con el nombre de isoaglutininas.

AGLUTININAS FRÍAS Y CALIENTES.

Los anticuerpos **naturales clase IgM** reaccionan mejor con el eritrocito a una temperatura de 4°C a 25°C recibiendo el nombre de aglutininas frías.

De igual manera se conocen como aglutininas frías a autoanticuerpos de la clase IgM que aglutinan eritrocitos a una temperatura que varía de 0 a 10°C (o a temperatura ambiente) y que aparecen en pequeñas cantidades en la sangre de personas sanas. La utilidad de investigar estos autoanticuerpos es apoyar en el diagnóstico de:

- Algunas anemias hemolíticas.
- Enfermedad crónica de aglutininas frías.
- Hemoglobinuria paroxística fría.
- Leucemia linfocítica crónica de linfocitos B.

En algunas otras enfermedades como la mononucleosis infecciosa, sífilis congénita, cirrosis hepática y tripanosomiasis se pueden encontrar elevaciones transitorias. Es importante anotar que una concentración elevada de aglutininas frías interfiere en las pruebas cruzadas y en la hemoclasificación.

Los anticuerpos IgG contra el eritrocito son sintetizados por **inmunización artificial**, o estimulados por antígenos eritrocitarios extraños como consecuencia de una transfusión de sangre incompatible, o en el embarazo por paso de sangre fetal a la circulación materna.

Estos actúan a 37°C, pero además se les debe ayudar para poder visualizar la aglutinación con albúmina bovina y suero de Coombs, por esto se les conoce también con el nombre de anticuerpos incompletos o monovalentes.

Cuadro 1 Antígenos y Anticuerpos del sistema ABO

Grupo sanguíneo	Antígeno.	Anticuerpo.
A	A	Anti-B
B	B	Anti- A
AB	A y B	no tienen



O	sustancia H	anti -A y anti-B
---	-------------	------------------

Genética del sistema ABO.

Todos nuestros rasgos y características están controladas por los genes, unidades básicas que se encuentran en los cromosomas, localizados en el núcleo celular dando cumplimiento a las leyes de Mendell. A diferencia de otras células del organismo, las reproductoras poseen cromosomas únicos. Después de la fertilización, se combinan para formar pares en las células del embrión; existe un gen responsable de la especificidad del grupo sanguíneo ABO de esta manera heredamos un gen del padre y otro de la madre.

Los genes A y B son dominantes con respecto al O, por lo tanto el fenotipo A puede resultar de los genotipos AO o AA y el fenotipo B puede ser la resultante de los genotipos BO o BB. Para el fenotipo O solo es posible el genotipo OO.

SISTEMA Rh.

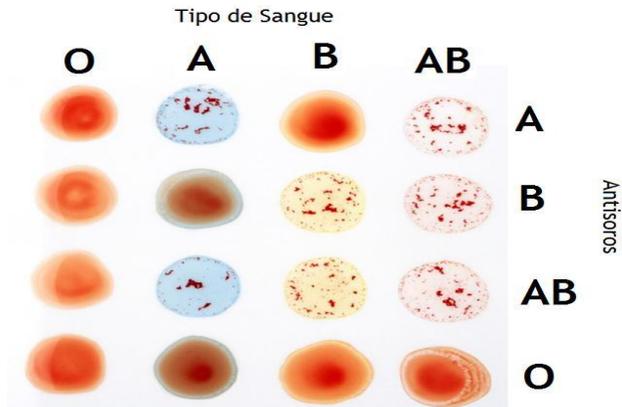
Descubierto por Levine y Stetson en 1939, es el segundo en importancia en medicina transfusional; es un conjunto de 40 antígenos aproximadamente. El antígeno D conocido como Rho o Rh' es el más importante. No hay anticuerpos naturales en el sistema Rh. Existen los siguientes antígenos o epitopes para el sistema Rh: **D, C, c, E, e**. La presencia del antígeno D es el que está indicando que la persona es Rh positiva.

Con base en estas premisas, los invito a realizar la técnica que permite demostrar en el laboratorio los grupos sanguíneos, **la hemoclasificación:**

Por principio inmunológico cada anticuerpo reacciona específicamente con su epitope; por lo tanto para identificar los antígenos del sistema ABO requerimos del Anti-A para identificar el epitope del antígeno A y el anti B para el B; con estos dos reactivos comerciales se identifican los antígenos y se habla de la **prueba directa.**

También tenemos la alternativa de conocer el antígeno (células conocidas A, B y O) para averiguar sobre la presencia de anticuerpos y estamos hablando de la **prueba inversa.**

HEMOCLASIFICACIÓN



Principio o fundamento.

Los anticuerpos anti A y anti B al ponerse en contacto con eritrocitos que presentan el epítipo correspondiente A o B provocan la aglutinación de estos.

Obtención de la muestra y conservación.

Se obtienen 5 cc de sangre venosa sin anticoagulante o 4 cc de sangre con anticoagulante (EDTA) en tubo marcado con el nombre del paciente.

Si se toma en tubo sin anticoagulante, centrifugar por 10 minutos y separar el suero en otro tubo debidamente rotulado.

Si no se procesa inmediatamente se debe guardar en la nevera.

REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- *Anti A y anti B
- *Solución salina al 0.85%
- *Células reactivas A, B, y O
- *Suero y células de la persona que se va a hemoclasificar.
- *Centrifuga.
- *Baño serológico.
- *Láminas para hemoclasificar.
- *Pipetas automáticas.
- *Puntas amarillas y azules.
- *frascos goteros.
- *Lámpara de lectura.



PROCEDIMIENTO

Prueba directa: utiliza eritrocitos del paciente y anticuerpos comerciales Anti A, Anti B, Anti A+B y Anti D.

Prueba indirecta: utiliza suero del paciente, más células de reactividad conocida A, B, O

Divida y marque la lámina según le indica el gráfico:

Prueba Directa		Prueba Indirecta	
A	50 uL de eritrocitos del paciente + 1 gota del Anti A	A	50 uL del suero del paciente. + 50 uL de células A
B	50 uL de eritrocitos del paciente. + 1 gota de Anti B	B	50 uL del suero del paciente. + 50 uL de células B
D	50 uL de eritrocitos del paciente. + 1 gota del Anti D	O	50 uL de suero del paciente. + 50 uL de células O

- Mezclar con palillos y agitar manualmente la lámina por tres minutos.
- Haga la lectura de la prueba, delante de la lámpara o en su defecto donde tenga buena luz, buscando donde halla aglutinación.

En el caso que no aglutine con el anti D hay que definir si el paciente es un D débil y para ello existe la Variante Du.

HEMOCLASIFICACIÓN EN TUBO.

1. Identifique muy bien a su paciente.
2. Obtenga 5 cc de sangre sin anticoagulante.
3. Separe el suero de las células.



4. Colocar en un tubo previamente identificado una alícuota de eritrocitos en estudio.
5. Lavar una vez en solución salina fisiológica.
6. Descartar el sobrenadante.
7. Preparar una suspensión al 5% en S.S
8. Marcar 3 tubos 12 x 75mm como A, B, y AB.
9. Mezclar.
10. Centrifugar a 3.400 r.p.m. x 15 segundos o a 1.000 rpm x 1 minuto.
11. Desprender el botón celular agitando suavemente el tubo.
12. Inclinar el tubo para observar presencia de aglutinación y cuantificar las cruces en una fuente de luz o preferiblemente en el visor de aglutinación.
13. Registrar inmediatamente con tubo en mano los resultados.

INTERPRETACIÓN.

4+ Sobrenadante transparente, botón compacto.

3+ Sobrenadante transparente, un agregado grande y otros más pequeños a su alrededor.

2+ Sobrenadante turbio, grumos medianos.

1+ Sobrenadante turbio, grumos pequeños que se disuelven con facilidad.

Neg. Ausencia de aglutinados

VII. TALLER.

Actividad 1.

Busque el significado de las siguientes palabras: sistema, plasma, eritrocitos, leucocitos, trombocitos, sistema retículo endotelial, antígenos, anticuerpos, aglutinación, aglutininas frías, aglutininas calientes, inmunoglobulinas.

Actividad 2.

- Escribe tu propia definición de epitope.
- ¿Qué es la respuesta inmunitaria?

Actividad 3

- ¿Qué diferencia existe entre un Anticuerpo natural y uno inmune?
- ¿Qué función cumple la albúmina y el suero de Coombs?
- Buscar la definición de genes, cromosomas, genotipo y fenotipo.



Actividad 4.

- Teniendo en cuenta que los genes A y B son dominantes con respecto al O, prepare su árbol familiar, señalando los genotipos y grupos sanguíneos de sus padres, de sus hermanos y el suyo.

Actividad 5.

- ¿Es posible que dos progenitores D positivos puedan tener un hijo Rh Negativo? Elabore el árbol familiar.

PRÁCTICA N° 2. PRUEBA DE EMBARAZO

I. INTRODUCCIÓN.

La Hormona Gonadotropina es una de las hormonas implicada en el funcionamiento del aparato reproductor masculino y del femenino. La Hormona Gonadotropina Coriónica (HGC), es el marcador de embarazo debido a que es producida en las mujeres por la placenta y mantiene las condiciones adecuadas para que se desarrolle el feto dentro del útero; además estimula la producción de testosterona en los testículos fetales.

II.OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Comprender el fundamento del método de inmunocromatografía utilizado en la prueba de gravindex

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de la inmunocromatografía
- Comprender la aplicabilidad clínica del método

III. MÉTODO: Inmunocromatografía

IV.FUNDAMENTO:

En la Inmunocromatografía la muestra se pone en contacto con el conjugado (Ac específico y reactivo de detección) y migran a una zona de captura donde se unen a otro Ac específico, evidenciándose por el desarrollo de un color.



Inmunocromatografía o Prueba Rápida

La inmunocromatografía se basa en la migración de una muestra a través de una membrana de nitrocelulosa. La muestra es añadida en la zona del conjugado, el cual está formado por un anticuerpo específico contra uno de los epítomos del antígeno a detectar y un reactivo de detección. Si la muestra contiene el antígeno a problema, éste se unirá al conjugado formando un complejo inmune y migrará a través de la membrana de nitrocelulosa. Sino, migrarán el conjugado y la muestra sin unirse.

La zona de captura está formada por un segundo anticuerpo específico contra otro epítomo del antígeno. Al llegar la muestra a esta zona, los complejos formados por la unión del antígeno y conjugado quedarán retenidos y la línea se coloreará (muestras positivas). En el caso contrario las muestras son negativas.

La zona control está formada por un tercer anticuerpo que reconoce al reactivo de detección. Cuando el resto de muestra alcanza esta zona, el anticuerpo se unirá al conjugado libre que no ha quedado retenido en la zona de captura. Esta línea es un control de que el ensayo ha funcionado bien, porque se colorea siempre, con muestras positivas y negativas.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos con sus tapones, gradillas, pipetas pasteur plásticas, papel absorbente, pinzas, pipetas automáticas de 50-200µL, puntas amarillas.

Los demás suministrados y requeridos por el kit comerciales disponibles.

Centrífuga de 3000 rpm.

VI. MUESTRA:

Suero u orina.

VIII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial para la determinación de la hormona.



INTERPRETACIÓN:

Negativo: Una sola línea de color que se desarrolla en la zona de control.

Positivo: Dos líneas de color, una en la zona de test y otra en la zona de control.

PRÁCTICA N°3. DETERMINACIÓN DE C4 (TURBIDIMETRÍA)

I. INTRODUCCIÓN

La turbidimetría y la nefelometría son métodos basados en el concepto de dispersión de la luz. La dispersión de la luz es la interacción de esta con partículas que provocan la desviación de su camino original causando turbidez. La luz puede ser dispersada de tres formas, diseminada, absorbida o transmitida.

La turbidimetría, mide la luz mediante la disminución en la intensidad del rayo incidente al pasar por la muestra. Se puede realizar en un espectrofotómetro. Nefelometría, mide la dispersión de luz como un incremento promedio de la luz que es dispersada cuando el rayo incidente pasa a través de la muestra. La mejor sensibilidad se logra cuando la fuente de luz es láser.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender los principios de los métodos turbidimetría y el desarrollo de las técnicas y la aplicabilidad como métodos tradicionales para la cuantificación de C4.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de la turbidimetría.
- Comprender la aplicabilidad clínica del método C4.

FRACCIONES DEL COMPLEMENTO

Se define el Complemento como un sistema funcional de unas 30 proteínas del suero, que interaccionan entre sí de modo regulado formando una cascada enzimática, permitiendo una amplificación de la respuesta humoral. La activación y fijación del complemento a microorganismos constituye un importantísimo mecanismo efector del sistema inmune, facilitando la eliminación del antígeno y



generando una respuesta inflamatoria. La mayoría de los componentes del complemento se sintetizan en el hígado (excepto C1q, D y P). El C1q lo sintetizan células epiteliales y el factor D, el adipocito.

El estudio de los factores del Complemento es la determinación de los componentes de uno de los factores que influyen directamente en la inflamación llamada cascada del Complemento, entre estos factores se suelen determinar principalmente los factores C3, C4, y la actividad del complemento total. La cascada puede ser iniciada por diversos factores, principalmente la unión de complejos antígeno-anticuerpo.

La actividad del complemento se mide para determinar si este o alguna de las fracciones se encuentra involucrado en el origen de alguna enfermedad, para evaluar la severidad de la misma o determinar la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, los pacientes con Lupus Eritematoso sistémico (LES) activo pueden tener niveles deprimidos de C3 y C4 y estos niveles del componente pueden servir como índice preliminar de la actividad de la enfermedad. La actividad del complemento puede variar en diferentes compartimentos del organismo. Por ejemplo, la actividad del complemento en la sangre de pacientes con Artritis Reumatoidea puede ser normal o estar aumentada, pero en el líquido articular está severamente deprimida. Los pacientes con septicemia gramnegativa y shock presentan a menudo una carencia de C3 y componentes de la vía alterna. Con frecuencia el C3 está deprimido en infecciones micóticas y en algunas infecciones parasitarias como la malaria.

El aumento de la actividad del complemento se puede observar en: cáncer, colitis ulcerativa. La disminución de la actividad del complemento se puede observar en: Angiodema hereditario, Cirrosis, Glomerulonefritis, Hepatitis, Nefritis por Lupus, Desnutrición, Rechazo de trasplante renal, LES.

III. MÉTODO: Turbidimetría

IV. FUNDAMENTO:

La proteína del complemento C4 presente en la muestra precipita en presencia de anticuerpos anti-C4 humana. La dispersión de luz generada por los complejos antígeno-anticuerpo es proporcional a la concentración de C4 y puede ser cuantificada por turbidimetría.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Algodón, alcohol.



- Tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial de C4.
- Cubetas plásticas.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.

VI. MUESTRA: Suero

VI. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.
Seguir las indicaciones de la casa comercial de la técnica de C4 donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

INFLAMACIÓN

PROTEINA C REACTIVA (PCR) - MONOTEST (AGLUTINACIÓN)

El método de aglutinación se basa en la unión de antígenos particulados a los anticuerpos, preferentemente de clase IgM. Las pruebas realizadas por este método suelen ser muy sensibles pero con poca especificidad en donde la unión Ag-Ac se evidencia macroscópicamente con la utilización de látex unido a anti-anticuerpos. El método inmunoturbidimétrico se usa con estándares para la determinación de proteínas específicas.

PRÁCTICA N°4 PROTEÍNA C REACTIVA (PCR)

I. INTRODUCCIÓN

La PCR forma parte de la inmunidad innata y su síntesis es inducida como respuesta al daño tisular, infecciones, procesos inflamatorios y neoplasias. Es producida principalmente por los hepatocitos y su expresión está regulada por proteínas producidas por las distintas poblaciones celulares del sistema inmune denominadas citocinas, como las pro-inflamatorias interleucina 1 (IL-1) e IL-6 y el factor de necrosis tumoral-alfa. Es una proteína sérica especial que sólo está presente durante episodios de inflamación aguda.



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender el principio del método de aglutinación, el desarrollo de la prueba de Proteína C reactiva (PCR) y la aplicabilidad clínica de las pruebas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de técnicas por el método de aglutinación.
- Comprender la aplicabilidad clínica de las pruebas de PCR como reactante de fase aguda.

III. MÉTODO: Aglutinación

IV. FUNDAMENTO:

La PCR, se detecta mediante una reacción inmunológica de aglutinación. El reactivo posee anticuerpos específicos anti-PCR absorbidos sobre partículas inertes de látex y al mezclarlo de forma directa con la muestra de suero, la presencia de PCR en este provoca la aglutinación de las partículas de látex.

PCR turbidimétrica es una prueba immunoturbidimétrica cuantitativa para la determinación en suero o plasma humano. Las partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti- PCR humana, son aglutinadas cuando se mezcla con muestras que contienen PCR. La aglutinación provoca un cambio de absorbancia, dependiendo de los contenidos de PCR del paciente, que se puede cuantificar por comparación con un calibrador de concentración conocida.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por los kit comerciales.
- Cubetas plásticas.
- Laminas fondo oscuro.
- Tubos de ensayo de 5 mL y gradillas.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Palillos.
- Centrífuga.



- Espectrofotómetro.

VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial de la técnica de PCR látex y turbidimétrica, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

PRÁCTICA N°5: MONOTEST

I. INTRODUCCIÓN

Monotest, es una prueba que determina la presencia de anticuerpos heterófilos (HE) específicos de la Mononucleosis Infecciosa (MI). La MI es una enfermedad causada por el virus Epstein-Barr, particularmente común en adolescentes y niños, que afecta al sistema reticuloendotelial, y presenta un amplio espectro de manifestaciones clínicas, que van desde una forma asintomática hasta una forma severa. Los pacientes normalmente desarrollan anticuerpos HE del tipo IgM y presentan un cuadro anormal de células blancas así como disfunciones hepáticas. El diagnóstico de la enfermedad se efectúa mediante la determinación de los anticuerpos HE o de Paul-Burnell, o de anticuerpos anti - antígenos estructurales del virus. Los primeros generalmente disminuyen a lo largo de la enfermedad, mientras que los segundos persisten a lo largo de la vida del paciente. Los anticuerpos HE son casi exclusivos de MI aunque existe una incidencia elevada de falsos resultados positivos. Esta enfermedad se transmite principalmente por el intercambio de saliva y al compartir con bebidas con otras personas.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender el principio del método de aglutinación, el desarrollo de la prueba de Monotest y la aplicabilidad clínica de la prueba.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de técnicas por el método de aglutinación.
- Comprender la aplicabilidad clínica de la prueba de Monotest como marcador de síndrome mononucleosido.



III. MÉTODO: Aglutinación

IV. FUNDAMENTO:

La prueba de MI-Látex es una técnica de aglutinación en placa para la detección cualitativa y semi-cuantitativa de anticuerpos heterófilos (HE) específicos de la Mononucleosis Infecciosa en suero humano. Las partículas de látex recubiertas con un extracto antigénico de membranas de hematíes bovinos, son aglutinadas por anticuerpos heterófilos específicos de la MI presentes en el suero del paciente.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial.
- Láminas fondo oscuro.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Centrífuga.

VI. MUESTRA: Suero

VI. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.
Seguir las indicaciones de la casa comercial, para las técnicas de aglutinación de Monotest, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

PRÁCTICA N° 6 PRUEBA DE TORCH (ENZIMOINMUNOANÁLISIS) – Primera y segunda parte

I. INTRODUCCIÓN

El TORCH o TORCHS es un conjunto de exámenes de laboratorio clínico que comprende la realización de una serie de determinaciones serológicas en las que se investiga la presencia de diferentes enfermedades de tipo infeccioso que tienen una característica en común como es ser transmitidas de madre a feto por vía placentaria (transmisión vertical), produciendo secuelas graves en el producto del embarazo si llegare a poseerla la madre y no se descubriere a tiempo. La sigla



TORCHS significa: T (Toxoplasma), O (Toxoplasma u Otros), R (Rubeola), C (Citomegalovirus), H (Herpes), S (Sífilis – VDRL, FTA-ABS). Con estos exámenes se realiza un estudio serológico completo a una mujer fértil o mujer embarazada con el fin de descartar o confirmar ausencia o presencia de cualquiera de estos agentes infecciosos.

El enzimoimmunoanálisis conocido por su sigla en inglés ELISA fue descrito en 1971 y es similar en principio al radioinmunoanálisis (RIA), pero depende de una enzima en lugar de un marcador radiactivo. Al comparar el ELISA con el RIA resulta ser menos costoso, algunas veces mayor sensibilidad y especificidad, amplias fechas de expiración y un alto grado de seguridad en su manejo.

En el ELISA una enzima conjugada con un Ac, reacciona con un sustrato incoloro para generar un producto con reacción de color. A este sustrato se le denomina sustrato cromógeno. En este método se utilizan varias enzimas como la peroxidasa de rábano, la fosfatasa alcalina extraída de intestino de ternera o de *E. coli* la β -galactosidasa de *E. coli*.

Existen algunas variantes de ELISA que permiten la detección cualitativa o la medición cuantitativa de Ag o Ac. Cada tipo de ELISA puede usarse de manera cualitativa para detectar la presencia de Ag o Ac. De otra forma se prepara una curva estándar con base en concentraciones conocidas de Ac o Ag a partir de la cual es posible determinar la concentración desconocida de una muestra.

Gracias al desarrollo y avances de la tecnología, el uso de anticuerpos monoclonales o anticuerpos cada vez más purificados, le han dado a las técnicas de ELISA un alto grado de sensibilidad y especificidad que nos han hecho avanzar mucho en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades infecciosas.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender los principios del método ELISA, el desarrollo de diversas técnicas y la aplicabilidad de estas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Diferenciar los tipos de ELISA.
- Adquirir destrezas en el montaje y manejo del ELISA.
- Determinar la aplicabilidad clínica de las diversas pruebas como ToxoIgM o IgG, RubeolaIgM o IgG, CMV IgM o IgG, Herpes IgM o IgG.



III. MÉTODO: ELISA

IV. FUNDAMENTO:

El principio de esta prueba está basado en la unión de un Ag purificado (cualquiera de los agentes microbianos a estudiar) fijado en el soporte, con el Ac específico presente en la muestra del paciente. Este complejo se pone en contacto con el conjugado (anti-IgM humana marcada enzimáticamente) que luego reacciona sobre un sustrato específico, evidenciándose esto, por el desarrollo de color.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por los kit comerciales disponibles.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules
- Centrífuga.
- Lector de microelisa.
- Lavador de placas Elisa.

VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial de la técnica de ELISA, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

INMUNIDAD ADAPTATIVA

ANTÍGENOS FEBRILES – VDRL – RPR (AGLUTINACIÓN, FLOCULACIÓN)

I. INTRODUCCIÓN

En el laboratorio clínico se dispone de diversos métodos a través de los cuales se realizan las determinaciones de metabolitos solicitados por el médico. Se puede afirmar que algunos métodos tradicionalmente han sido más atractivos que otros porque ofrecen mayor sencillez en su procesamiento y mayor rapidez en la



obtención del resultado. Entre estos encontramos, aglutinación, inmunocromatografía y floculación.

El método de floculación un proceso mediante el cual, con la adición de sustancias floculantes, se agrupan las sustancias coloidales presentes, cuyo resultado positivo depende del grado de precipitación por floculación que se produce en el material que se analiza.

VI. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender los principios de los métodos de aglutinación y floculación, el desarrollo de diversas técnicas y la aplicabilidad de estas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de técnica de aglutinación y floculación, tanto para pruebas cualitativas como semi-cuantitativas.
- Identificar la presencia de anticuerpos no treponémicos en el suero de pacientes.
- Adquirir destrezas en la realización del método de floculación en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo.
- Determinar la aplicabilidad clínica de las pruebas de antígenos febriles, VDRL y RPR.

PRÁCTICA N°7. ANTÍGENOS FEBRILES

I. INTRODUCCIÓN

La prueba de antígenos febriles es una técnica de aglutinación en lámina para la detección directa y semi-cuantitativa de seis antígenos. Son suspensiones normalizadas de bacterias teñidas que se utilizan para identificar y cuantificar anticuerpos específicos que se desarrollan durante algunas infecciones febriles tales como brucelosis, salmonelosis y ciertas rickettsiosis.

Esta prueba determina la presencia de anticuerpos Acs séricos contra *Salmonella typhi* (Tífico O, Tífico H, Paratífico A y Paratífico B), *Rickettsiassp* (*Proteus* OX19) y



Brucellasp (Brucellaabortus). Es de gran utilidad para ayuda diagnóstica rápida de infección por alguno de los gérmenes antes mencionados.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender los principios de los métodos de aglutinación en el desarrollo de diversas técnicas y la aplicabilidad de estas en la identificación y caracterización de estados febriles agudos y crónicos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de técnica de aglutinación tanto para pruebas cualitativas como semi-cuantitativas.
- Identificar la presencia de anticuerpos en el suero de pacientes dirigidos contra antígenos febriles de importancia

III. MÉTODO: Aglutinación

IV. FUNDAMENTO:

El antígeno en suspensión aglutina en presencia del correspondiente anticuerpo homólogo en las muestras ensayadas.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial.
- Láminas fondo claro.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Centrífuga.

VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial, para la técnica de aglutinación de antígenos febriles, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos



PRÁCTICA N°8. VDRL– RPR / VDRL EN LCR

I. INTRODUCCIÓN

Sífilis, es una enfermedad venérea causada por el *Treponema pallidum*, que invade las mucosas intactas o la piel en áreas de abrasiones. El diagnóstico de esta enfermedad sufre la carencia de un método para cultivar el microorganismo en medios de laboratorio y la dificultad para detectarlo en estadios de la enfermedad en los que no se observan lesiones epidémicas. Sin embargo, desde el comienzo de la infección aparecen en el suero del individuo infectado ciertas sustancias denominadas “reaginas”, que reaccionan con antígenos de cardiolipina, lecitina y colesterol. Estas reaginas junto a los signos clínicos son por lo tanto los procedimientos más rápidos y útiles disponibles para diagnóstico de sífilis.

La importancia clínica de las pruebas de VDRL y RPR, consiste en la detección temprana de la Sífilis. Por otra parte, cuando se sospecha que un individuo presenta compromiso cerebral con Sífilis (Neurosífilis), se puede realizar VDRL en una muestra de Líquido Cefalorraquídeo (LCR) obtenido por punción lumbar.

Por lo anterior, VDRL y RPR son pruebas de tamizaje de sífilis en las que se determina la presencia de Acsreagínicos producidos por la interacción del *Treponema pallidum* y el cuerpo del paciente.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender los principios de los métodos de aglutinación y floculación, el desarrollo de diversas técnicas y la aplicabilidad de estas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de técnica de aglutinación y floculación, tanto para pruebas cualitativas como semi-cuantitativas.
- Identificar la presencia de anticuerpos no treponémicos en el suero de pacientes.
- Adquirir destrezas en la realización del método de floculación en muestras de suero y líquido cefalorraquídeo.



- Determinar la aplicabilidad clínica de las pruebas de antígenos febriles, VDRL y RPR.

III. MÉTODO: Aglutinación y Floculación

IV. FUNDAMENTO:

VDRL: Las reaginas o reaginas, presentes en individuos afectados por *T. pallidum* se detectan en suero o LCR por la reacción de un antígeno cardiolipínico purificado y estabilizado. Si la muestra contiene reagina, ésta se unirá al antígeno produciendo una floculación visible en microscopio

RPR-CARBÓN: Determina la presencia de Acsreagínicos séricos producidos por la interacción del *Treponema pallidum* y el cuerpo del paciente. El reactivo tiene los componentes del antígeno del VDRL más carbón coloidal y se le ha adicionado cloruro de colina cuya función es de inhibir o inactivar sustancias que podrían interferir en la reacción. Las reaginas plasmáticas, anticuerpos dirigidos contra antígenos derivados de fuentes no treponémicas, producen agregaciones con el antígeno, coaglutinando con las partículas de carbón.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por los kit comerciales disponibles.
- Láminas excavadas fondo claro.
- Solución salina al 0.85%.
- Palillos
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Centrífuga.
- Microscopio.

VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.



Seguir las indicaciones de la casa comercial, para la técnica de floculación de VDRL y RPR carbón, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

PRÁCTICA N° 9. CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS (TURBIDIMETRÍA)

I. INTRODUCCIÓN

Durante la respuesta inmune activa (producida por el huésped) los macrófagos inducen a los linfocitos T para producir interleuquinas, las cuales promueven el crecimiento y diferenciación de los linfocitos B para que produzcan anticuerpos o inmunoglobulinas (inmunidad humoral). Los tipos de inmunoglobulinas y sus funciones son:

- Inmunoglobulina M (Ig M): La primera clase de anticuerpo producido en respuesta a un antígeno es la Ig M. Es el anticuerpo más grande, formado por 5 monómeros. La Ig M fija el complemento muy bien y por lo tanto causa la lisis de bacterias, envolturas víricas y células infectadas.
- Inmunoglobulina G (Ig G): Es el anticuerpo más común, representando el 80% de las inmunoglobulinas presentes en el suero. Actúa neutralizando toxinas y virus y facilitando la fagocitosis de bacterias y virus. También fija el complemento causando lisis de bacterias. Las Ig G pueden atravesar la placenta confiriendo inmunidad pasiva al niño.
- Inmunoglobulina A (Ig A): Es la inmunoglobulina que provee inmunidad humoral en las secreciones de mucosas como lágrima, saliva, moco intestinal y fluido seminal y recibe el nombre de IgA secretoria. La Ig A es el mayor componente proteico de la leche materna confiriendo inmunidad pasiva frente a los patógenos entéricos en el recién nacido. En el suero aparece como un monómero pero en ocasiones se observan formas poliméricas (dímeros, trímeros y algunos tetrámeros). En las secreciones mucosas aparece como un dímero siendo este dímero el responsable de la neutralización de toxinas, alérgenos, bacterias y virus antes de que penetren en el cuerpo a través de las membranas mucosas. La producción diaria de IgA secretoria es mayor que cualquiera otra clase de Ig. Todos los días un ser humano libera 5 a 15 g de IgA secretoria a secreciones mucosas. Tiene una función efectora relevante en las superficies mucosas, que son los principales sitios de entrada de los microorganismos.
- Inmunoglobulina D (Ig D): Representa aproximadamente el 0,25 % de las inmunoglobulinas séricas totales. Es un marcador de diferenciación de la etapa de maduración de los Linfocitos B que es una molécula que se expresa en la superficie de estas células.



- Inmunoglobulina E (Ig E): Es el anticuerpo de la alergia, responsable de la hipersensibilidad a muchos antígenos. La función de la Ig E no es causar alergias, sino probablemente sea montar una respuesta segura frente a los parásitos que entran en el cuerpo ya que la gente que vive en los trópicos, donde son más comunes los parásitos, tienen elevado los niveles de Ig E.

Las pruebas de aglutinación en las que se entrecruzan una partícula o antígeno insoluble y su correspondiente anticuerpo son de tipo cualitativo o semi-cuantitativo. Sólo se pueden cuantificar cambiando el sistema de reacción de portaobjetos a cubeta como en la turbidimetría.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Afianzar los principios de los métodos de aglutinación y turbidimetría el desarrollo de las técnicas y la aplicabilidad de estas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fomentar las destrezas en el montaje y manejo de la turbidimetría y aglutinación.
- Analizar la aplicabilidad clínica de las pruebas.

III. MÉTODO: Aglutinación y Turbidimetría

IV. FUNDAMENTO:

La Ig presente en la muestra sérica precipita al unirse con Acs anti-Ig humana. La dispersión de la luz generada por los complejos Ag-Ac es proporcional a la concentración de la Ig y puede ser cuantificada por turbidimetría.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial disponible de inmunoglobulinas.
- Cubetas plásticas.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas.
- Centrífuga.
- Espectrofotómetro.



VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial, para la técnica de turbidimetría para inmunoglobulinas, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

PRÁCTICA N°10. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS (QUIMIOLUMINISCENCIA)

I. INTRODUCCIÓN

La quimioluminiscencia es un inmunoensayo que se basa en la emisión de luz asociada con la energía. Es definida también como la emisión de fotones de luz asociada con la disipación de energía con una sustancia electrónicamente excitada, esto se da a través de una reacción enzima sustrato.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender el fundamento del método de quimioluminiscencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en la realización del método de quimioluminiscencia.
- Analizar la aplicabilidad clínica de la medición de hormonas.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS (FSH Y LH)

La Hormona Estimulante del Folículo (FSH) y la Hormona Luteinizante (LH) están estrechamente involucradas en el control del crecimiento de los tejidos gonadales, los cuales sintetizan y segregan hormonas sexuales tanto masculinas como femeninas. FSH y LH son glicoproteínas que se producen en la glándula pituitaria anterior (Hipófisis) en respuesta a la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) producida en el Hipotálamo. Se encargan de coordinar la función de los ovarios influyendo directamente sobre la producción de otras hormonas (estrógenos y progesterona) y la ovulación: Se considera, por consiguiente, que son las encargadas de establecer el ritmo del ciclo menstrual.



FSH y LH, así como las glicoproteínas como TSH y HCG, consiste de varias subunidades o polipéptidos diferentes denominados alfa y beta. Estas cuatro hormonas se asemejan estructuralmente en las subunidades alfa; la diferencia entre ellas se encuentra en la composición de aminoácidos de las subunidades beta, que cuenta para su diferenciación inmunológica y sus propiedades biológicas. Reciben el nombre de Gonadotropinas, término que viene de *gónadas* u órganos sexuales (testículos y ovarios) y *trop*(vocablo griego antiguo) que significa actuar sobre algo; por lo tanto Gonadotropina significa que actúan sobre los órganos sexuales.

La FSH regula el desarrollo, el crecimiento, la maduración puberal, y los procesos reproductivos del cuerpo. En la mujer, estimula el crecimiento y la maduración de los folículos ováricos(cada folículo contienen a su vez un óvulo u ovocito, el cual será liberado durante la ovulación) y de Estradiol durante la primera mitad del ciclo menstrual. En los hombres, estimula la producción de espermatozoides actuando sobre las células de Sertoli de los testículos, estimulando la síntesis de la Inhibina, que demuestra inhibir específicamente la secreción posterior de la FSH, y la proteína de enlace de andrógenos. Así constituye un soporte directo de la espermatogénesis.

La LH, en los hombres regula la secreción de testosterona, actuando sobre las células de Leydig en los testículos; y en la mujer controla la maduración de los folículos, la ovulación, la iniciación y mantenimiento del cuerpo lúteo que sintetiza la progesterona. El cuerpo lúteo se desintegra después de diez días aproximadamente si no se presenta la fertilización.

Los niveles de FSH y LH indican el estado y funcionalidad de los ovarios. Normalmente, se analizan los niveles de ambas hormonas para descartar insuficiencias ováricas o problemas en la glándula pituitaria o el hipotálamo. El ciclo menstrual se divide en fase folicular y fase luteal por el aumento de ciclo medio de las gonadotropinas (LH y FSH). En la medida en que avanza la fase folicular, se disminuye la concentración de FSH. Casi al momento en que ocurre la ovulación, es decir aproximadamente en el ciclo medio, la FSH alcanza un pico (menor en magnitud que la LH) hasta alcanzar su nivel más elevado.

Niveles de Referencia

	FSH	LH	Unidades
Fase folicular (antes de la ovulación)	2 - 10	2 - 6	U/L
Fase ovulatoria	8 - 20	6 - 20	U/L
Fase lútea (tras la ovulación)	2 - 8	3 - 8	U/L
Menopausia	> 20	>30	U/L



III. MÉTODO: Quimioluminiscencia

IV. FUNDAMENTO:

Al pozo recubierto con estreptavidina se le adiciona el Ag (hormona nativa en la muestra o calibrador) y los Acs monoclonales marcados con biotina y Acs marcados con enzima dirigidos contra epítopes claramente diferenciados. La reacción entre los distintos anticuerpos forma un complejo en sándwich que se enlaza con la estreptavidina recubierta al pozo. La fracción de hormona unida al anticuerpo es separada del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo se cuantifica mediante reacción utilizando sustrato adecuado para producir luz y es directamente proporcional a la concentración del antígeno nativo.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial disponible.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas.
- Centrífuga.
- Equipo de quimioluminiscencia.

VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial, para la técnica de quimioluminiscencia, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

RESPUESTA INMUNE CONTRA AGENTES INFECCIOSOS

ASTO – DENGUE - (AGLUTINACIÓN, INMUNOCROMATOGRAFÍA)

INTRODUCCIÓN



El método de aglutinación se basa en la unión de Acs particulados a los Acs preferentemente de clase IgM. Suele tratarse de pruebas muy sensibles pero con poca especificidad.

La Inmunocromatografía se puede realizar mediante un dispositivo simple desarrollado para detectar la presencia o ausencia de un compuesto objetivo en la muestra. Este tipo de pruebas son utilizadas comúnmente para el diagnóstico médico en un formato de tira o casete, en el cual la muestra problema fluye a lo largo de un sustrato sólido por medio de una acción capilar.

PRÁCTICA N° 11. ASTO

I. INTRODUCCIÓN

ASTO, es una prueba que demuestra la presencia de anticuerpos generados por el organismo contra la enzima estreptolisina O, la cual es producida por la bacteria *Streptococcus* β -hemolítico del grupo A y causa destrucción de los glóbulos rojos. Estos Acs se elevan a la semana y alcanzan el pico máximo a las 3 o 4 semanas, para descender gradualmente. Pueden permanecer títulos altos hasta los 6 meses posteriores a la erradicación de la infección primaria. Estos Acs pueden estar elevados en Faringitis estreptocócica, Endocarditis bacteriana, Glomerulonefritis, Fiebre reumática, Escarlatina.

II. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Afianzar la comprensión y destreza en el manejo de los métodos de aglutinación

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fomentar las destrezas en el montaje y manejo de técnica de aglutinación
- Determinar la aplicabilidad clínica de las pruebas de ASTO

III. MÉTODO: Aglutinación

IV.FUNDAMENTO:



La prueba rápida de ASTO-látex es una técnica de aglutinación en lámina para la detección directa y semi-cuantitativa de anti-estreptolisina O (ASTO). El antígeno, una suspensión de partículas de látex sensibilizadas con estreptolisina O, aglutina en presencia de anticuerpos específicos presente en el suero.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial.
- Láminas fondo oscuro.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Centrífuga.

VI. MUESTRA: Suero.

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial, para las técnicas de aglutinación de ASTO, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos

PRÁCTICA N° 12. DENGUE

I. INTRODUCCIÓN

Dengue, es una enfermedad infecciosa producida por un *Flavivirus*, Virus del Dengue, que es transmitido por mosquitos *Aedes*. Los cuatro serotipos del virus (DEN-1, DEN-2, DEN-3, DEN-4) son similares, pero se diferencian antigénicamente de manera suficiente que una infección con uno de los serotipos provee una inmunidad cruzada sólo para algunos meses.

Los Acs IgM se detectan en la mayoría de los pacientes después de cinco días del comienzo de los síntomas y persisten 2-3 meses. Los Acs IgG aparecen unos días después y proporcionan una inmunidad de por vida a este serotipo.

La infección causa síntomas gripales (síndrome gripal), y en ocasiones evoluciona hasta convertirse en un cuadro potencialmente mortal, llamado dengue grave. Es



una infección muy extendida que se presenta en todas las regiones tropicales y subtropicales del planeta. La prevención y el control del dengue dependen exclusivamente de las medidas eficaces de lucha contra el vector transmisor.

II. OBJETIVO

OBJETIVO GENERAL

Afianzar la comprensión y destreza en el manejo de los métodos de Inmunocromatografía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fomentar las destrezas en el montaje y manejo de técnica de Inmunocromatografía.
- Determinar la aplicabilidad clínica de las pruebas de Dengue.

III. MÉTODO: Inmunocromatografía.

IV. FUNDAMENTO:

Los Acs anti-dengue en la muestra del paciente reaccionan con las proteínas recombinantes de envoltura de dengue, formando inmunocomplejos que migran a lo largo de la membrana y son capturados por anti-Ig humana monoclonal en la línea de prueba. El exceso de inmunocomplejos y/o las partículas de oro coloidal que no reaccionaron continúan migrando y son inmovilizados formando la línea control.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial disponible.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL.
- Puntas amarillas.
- Centrífuga.
- Microscopio.



VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

PRÁCTICA N° 13. β -HCG(QUIMIOLUMINISCENCIA)

I. INTRODUCCIÓN

En el método de quimioluminiscencia el suero del paciente o los controles se agregan en la placa donde se adiciona también el conjugado y se obtiene una reacción de competencia entre el conjugado de enzimas y la molécula en el suero del paciente, por un número limitado de anticuerpos inmovilizados en el pozo. Después se cuantifica la actividad de la enzima por reacción con un sustrato adecuado para producir luz.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Reforzar la comprensión y destreza en el manejo del método de quimioluminiscencia.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Afianzar las destrezas en el montaje y manejo de técnica de quimioluminiscencia.
- Determinar la aplicabilidad clínica de la prueba de β -HCG.

β -HCG



Un marcador tumoral es una sustancia que es producida por el cuerpo en respuesta al cáncer, o es producida por el cáncer mismo. Algunos de estos marcadores son específicos a un cáncer, mientras que otros se ven en varios tipos de cáncer. Estos marcadores se utilizan generalmente para evaluar la respuesta del paciente al tratamiento o para monitorear en caso de recurrencia (si el cáncer regresa después del tratamiento). Algunos marcadores pueden ayudar a los médicos a determinar el pronóstico y el tratamiento.

Idealmente, los marcadores se podrían utilizar como herramientas para la detección temprana ya que un diagnóstico temprano de cáncer favorece la implementación de un tratamiento antes de haya tenido oportunidad de crecer y extenderse. Hasta ahora, el único marcador tumoral que ha ganado aceptación amplia como herramienta de detección temprana es el Antígeno Específico de la Próstata (PSA) para el cáncer de la próstata. Otros marcadores no son bastante específicos (demasiados positivos falsos, conduciendo a exámenes de seguimiento costosos e innecesarios), o no se elevan bastante temprano en la vida del cáncer, por lo tanto que este no se puede detectar antes de que los síntomas comiencen a aparecer. Además, algunas sustancias utilizadas como marcadores se producen naturalmente en el cuerpo, y un nivel "normal" no es siempre cero. Por otra parte, no todos los marcadores se elevan en todos los casos de los cánceres para que se utilicen para detectarlos, y no son provechosos en todos los pacientes. Ejemplo, el antígeno carcinoembrionario (CEA) se utiliza para detectar la recurrencia del cáncer del colon, pero solo se produce en 70-80% de los casos. Además, solamente el 25% de los casos que se limitan al colon (primeras etapas) tienen el CEA elevado, así que no pueden detectar siempre el cáncer del colon en sus primeras etapas.

Algunos otros marcadores a detectar en sangre son: Alfa-fetoproteína (AFP), CA 15-3 (antígeno carbohidrato 15-3), CA 19-9, CA 125, CA 27.29, PAP (fosfatasa ácida prostática), Deshidrogenasa láctica (LDH). En orina también se pueden determinar otros como por ejemplo: BTA (Antígeno del tumor de la vejiga); Catecolaminas como VMA (ácido Vanililmandélico) y HVA (ácido homovanílico).

III. **MÉTODO:** Quimioluminiscencia

IV. **FUNDAMENTO:**

Al pozo recubierto con estreptavidina se le adiciona el Ag (hormona nativa en la muestra o calibrador) y los Acs monoclonales marcados con biotina y Acs marcados con enzima dirigidos contra epítopes claramente diferenciados. La reacción entre



los distintos anticuerpos forma un complejo en sándwich que se enlaza con la estreptavidina recubierta al pozo. La fracción de hormona unida al anticuerpo es separada del antígeno no unido mediante decantación o aspiración. La actividad de la enzima presente en la superficie del pozo se cuantifica mediante reacción utilizando sustrato adecuado para producir luz y es directamente proporcional a la concentración del antígeno nativo.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial disponible.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas.
- Centrífuga.
- Equipo de quimioluminiscencia.

VI. MUESTRA: Suero.

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de la casa comercial, para la técnica de quimioluminiscencia, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

PRÁCTICA N° 14 VIH (ELISA E INMUNOCROMATOGRAFÍA) – IgE (ELISA)

I. INTRODUCCIÓN

Los métodos Elisa e Inmunocromatografía permiten la realización de innumerables pruebas de laboratorio en el área de Inmunología y además se utilizan con gran frecuencia ya que ofrecen muy buena especificidad.



II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Afianzar la comprensión y destreza en el manejo de los métodos Elisa e Inmunocromatografía.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar destrezas en el montaje y manejo de Elisa e Inmunocromatografía.
- Determinar la aplicabilidad clínica de pruebas como VIH e IgE.

VIH

El Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH) causa el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) de amplia distribución mundial. Este es un virus ARN que se especializa en las células blancas del sistema inmunológico, específicamente Linfocitos CD4. Estas son células T ayudadoras que controlan la respuesta del sistema inmunológico a infecciones.

La prueba de VIH tradicionalmente es realizada por diversos métodos en una primera búsqueda de la presencia de la infección (prueba presuntiva). Posteriormente debe realizarse una prueba confirmatoria (Western Blot).

III. MÉTODO: Elisa e Inmunocromatografía.

IV. FUNDAMENTO:

Elisa: El principio está basado en la unión de un Ag purificado (fase sólida) con el Ac presente en la muestra del paciente. Este complejo se pone en contacto con el conjugado que luego reacciona sobre un sustrato específico, evidenciándose por el desarrollo de color.

Inmunocromatografía: La muestra se pone en contacto con el conjugado (Ac específico y reactivo de detección) y migran a una zona de captura donde se unen a otro Ac específico, evidenciándose por el desarrollo de un color.

VI. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:



- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial disponible.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Tubos de ensayo de 5 ml y gradillas.
- Centrífuga.
- Equipo de Microelisa.

VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.
Seguir las indicaciones de la casa comercial, para la técnica de quimioluminiscencia, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

AUTOANTICUERPOS (inmunofluorescencia indirecta–aglutinación)

I. INTRODUCCIÓN

La Inmunofluorescencia es esencialmente un método histoquímico o citoquímico para la identificación y localización de antígenos. El anticuerpo específico es conjugado con los compuestos fluorescentes, resultando un trazador sensible con reactividad inmunitaria inalterada. El anticuerpo conjugado es añadido a las células o los tejidos y se fija a los antígenos en caso positivo de reconocimiento, formando un complejo inmunitario estable. Las otras proteínas no específicas son eliminadas por medio de lavados y la presentación resultante es observada al microscopio fluorescente.

La inmunofluorescencia indirecta específicamente permite la identificación y cuantificación de anticuerpos en sueros no marcados, elimina la necesidad de purificar y conjugar de manera individual cada muestra de suero.



PRÁCTICA N°15. ANA (IFI)

I. INTRODUCCIÓN

Los Anticuerpos Antinucleares (ANA) son autoanticuerpos que tienen la capacidad de unirse a ciertas estructuras en el núcleo de las células. Estos ANA se encuentran en los pacientes cuyo sistema inmunológico puede estar predispuesto a causar inflamación contra los propios tejidos del cuerpo e indican la posible presencia de autoinmunidad, por lo tanto, proporcionan el indicio para considerar la posibilidad de una enfermedad autoinmune. Un resultado positivo de ANA varía en la sensibilidad en diferentes trastornos autoinmunes y es más sensible en el Lupus Eritematoso Sistémico (LES).

Sensibilidad en el LES: 93 %, Esclerodermia: 85 %; Enfermedad mixta del tejido conectivo: 93 %; Polimiositis / dermatomiositis: 61 %; Artritis Reumatoidea: 41 %; Síndrome de Sjögren: 48 %; Artritis poliarticular crónica juvenil: 71 %; Tiroiditis de Hashimoto: 46 %; Enfermedad de Graves: 50 %; Cirrosis biliar primaria: 10-40 %.

Una de las características del Lupus Eritematoso Sistémico (LES) es la producción de auto-anticuerpos, como los Anticuerpos Anti-Nucleares (ANA) que se pueden producir contra varios de los constituyentes del núcleo, como DNA, DNA-histona, RNA nuclear, ribonucleasa, etc. Representan una marca distintiva de la enfermedad y su presencia es un requisito para el diagnóstico de la entidad, y sólo en circunstancias excepcionales, en menos del 2% de los pacientes, están ausentes temporalmente durante el curso de la misma. Los Acs más frecuentemente encontrados son anti-DNA nativa o de doble hélice, que se correlacionan muy directamente con la actividad de la enfermedad y con el daño renal. El 90% de los pacientes con LES presenta un patrón de inmunofluorescencia de tipo anillo o periférico, que por lo general se debe a Acs anti-DNA.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender el fundamento de los métodos IFI, el desarrollo de las técnicas y su aplicabilidad.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de IFI
- Determinar la aplicabilidad clínica de las pruebas.



- Analizar los diversos tipos de autoanticuerpos detectados.

III. **MÉTODO:** Inmunofluorescencia indirecta

IV. **FUNDAMENTO:**

IFI: Los anticuerpos antinucleares del suero se unen a su correspondiente antígeno presente en la fase sólida. Una vez unidos, los anticuerpos se ponen de manifiesto mediante la incubación con un anticuerpo contra las inmunoglobulinas humanas conjugado con fluoresceína y se visualizan por microscopía de fluorescencia.

V. **REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:**

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial.
- Agua destilada estéril.
- Papel filtro.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Centrífuga.
- Microscopio de fluorescencia.
- Agitador de Manzini.

VI. **MUESTRA:** Suero

VII. **PROCEDIMIENTO:**

Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.

Seguir las indicaciones de las casas comerciales, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

PRÁCTICA N°16 RA-TEST / FACTOR REUMATOIDEO RF

I. **INTRODUCCIÓN**

Esta prueba determina la presencia y nivel del Factor Reumatoideo en la sangre. El factor reumatoideo es un anticuerpo que se enlaza a una inmunoglobulina (Ig)



formando una molécula llamada complejo inmune, el cual puede activar varios procesos inflamatorios en el cuerpo.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Comprender el fundamento de los métodos, el desarrollo de las técnicas, así como afianzar el manejo del método de aglutinación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la aplicabilidad clínica de las pruebas.
- Analizar los diversos tipos de autoanticuerpos detectados.

III. MÉTODO: Aglutinación}

VI. FUNDAMENTO:

La prueba de factor reumatoideo en látex es una técnica de aglutinación en lámina para la detección directa y semicuantitativa del RF. Las partículas de látex recubiertas con IgG, aglutinan con el suero del paciente si este presenta el factor reumatoideo.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS:

- Algodón, alcohol, tubos de ensayos secos para la toma de muestra.
- Los suministrados y requeridos por el kit comercial.
- Láminas fondo oscuro.
- Solución salina.
- Pipeta automática de 5 a 25 uL, de 50 a 200 uL y de 200 a 1000 uL
- Puntas amarillas y azules.
- Centrífuga.
- Agitador de Manzini.

VI. MUESTRA: Suero

VII. PROCEDIMIENTO:



Tomar 2 cc de sangre para la obtención del suero.
Seguir las indicaciones de las casas comerciales, donde el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos prácticos.

BIBLIOGRAFÍA

Amich Oliveras Silvia. Inmunología: manual de técnicas de investigación en el laboratorio. Editorial Acribia. España. 2008.

Bernard HenryJhon. Laboratorio en el Diagnóstico Clínico. Marbán Libros. España. 2010.

Conrad Karsten, Schöbler Werner, Hiepe Falk, Fritzler Marvin J. Autoanticuerpos en Enfermedades Autoinmunes Específicas de Órgano. 1ª edición. PabstScience Publisher. Alemania. 2014.

Regueiro González José R. Inmunología: biología y patología del sistema inmune. 4ª edición. Editorial Médica Panamericana. España. 2010.

Rojas M. William, Anaya C. Juan-Manuel, Cano R. Luz Elena, Aristizábal B. Beatriz H, Gómez O. Luis Miguel, Lopera H. Damaris. Inmunología de Rojas. 17ª edición. Corporación para Investigaciones Biológicas. Colombia. 2015.

Stites Daniel, Abba I. Terr, Tristram G. Parslow. Inmunología Básica y Clínica. 9ª edición. Editorial Manual Moderno. México 2000.

Werner Luttmann. Autoanticuerpos en Enfermedades Autoinmunes Específicas de Órgano. 1ª edición. PabstScience Publisher. Alemania. 2014.



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

Campus Cartagena
Centro Comercial Pasaje de la Moneda
Cra. 8B #8-56
Tel. 6517088 Ext 1202

Campus Barranquilla
Cra 54 #66-54
Tel. (5) 3602197 Ext 1319

www.curn.edu.co

Institución Universitaria | Vigilada Mineducación
Reconocimiento personería jurídica: Resolución 6644 del 5 de junio de 1985 Mineducación.

