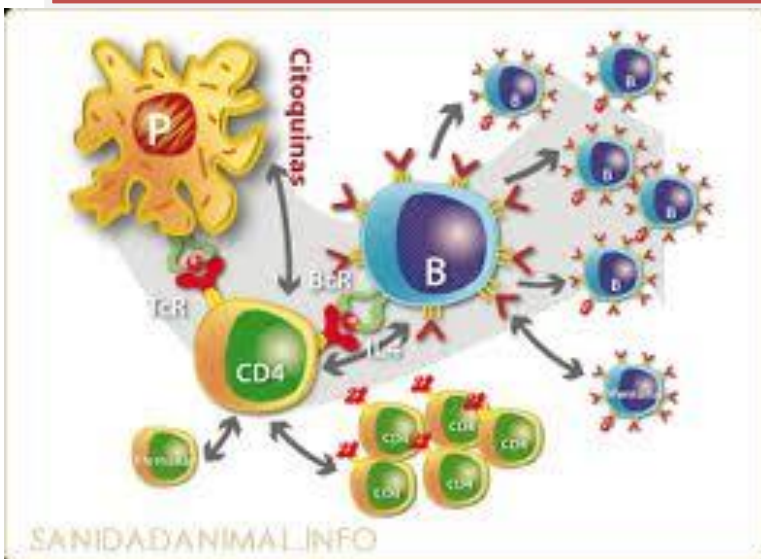




2,013

Manual de prácticas de laboratorio de Inmunología



Elaboración

Licda. Ana Margarita Paz Morales de Ramírez (QB, MA)

Licda. Isabel Cristina Gaitán Fernández (QB, MA)



REGLAMENTO GENERAL DE LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

1. El alumno deberá ingresar al laboratorio con equipo de seguridad:
 - Bata blanca hasta la rodilla y de manga larga (con su respectivo nombre y el logo de la universidad bordado).
 - Gafas de seguridad.
2. Para tener derecho a ingresar al laboratorio, el alumno debe entregar al inicio de cada práctica:
 - Cuaderno completo de laboratorio con los aspectos solicitados para la práctica.
 - Reporte de la práctica anterior.

El laboratorio inicia puntualmente, no se permitirá el ingreso tarde bajo ninguna excusa. NO SE REPONDRÁ LABORATORIO POR NINGÚN MOTIVO

3. El alumno no podrá ingresar al laboratorio si:
 - Si tiene el cuaderno incompleto o hay evidencia de copia entre dos o más compañeros de laboratorio, de lo contrario tendrá inasistencia aunque haya firmado la lista de asistencia.
4. En el laboratorio está prohibido el ingreso de:
 - 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, suéteres o chumpas que no sean del uniforme.
 - Mochilas, bolsos u otro accesorio que no sea requerido por el docente. Todas las pertenencias deberá dejarlas en los casilleros asignados
5. No puede trabajar en el laboratorio si tiene uñas acrílicas y joyería.
6. Las personas con cabello largo deben recogerlo con una cola o gancho (no fleco).
7. 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 licenciadas a cargo.
8. En caso de que el estudiante dañe parcial o totalmente un material, deberá firmar un vale con su nombre, número de puesto, descripción del material



dañado, fecha y firma, comprometiéndose a reponer el material durante las dos prácticas siguientes, de no hacerlo perderá el derecho a ingresar al laboratorio.

NOTA: El estudiante deberá estar solvente al momento de realizar los exámenes parciales y el final de laboratorio.

9. 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.
10. 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 (Práctica No. 1).



ASPECTOS A EVALUAR

1. PLANIFICACION

Generalidades para presentar el cuaderno

El cuaderno debe ser:

- De pasta dura, tamaño media carta de 80 hojas con líneas (no espiral).
- Forrado con plástico sin color en particular.
- Identificado en la primera hoja

El **cuaderno de laboratorio** contiene las siguientes secciones:

Sección	Contenido	Valor (pts)
Encabezado	Indicar claramente el número, título y la fecha en que se llevará a cabo la práctica de laboratorio.	---
Objetivos	Deberá de escribir los objetivos de cada práctica, para familiarizarse con el contenido que se espera aprender en cada una de ellas.	5
Diagrama de flujo	Realizar una representación gráfica del procedimiento que se llevará a cabo en el laboratorio en forma clara y resumida.	10
Toxicidades/ Valores normales/	Para todos los reactivos utilizados en la práctica deberá indicar en una tabla: Toxicidad por contacto en piel Toxicidad por contacto en ojos: Toxicidad por inhalación: Toxicidad por ingestión: Es de vital importancia incluir los efectos de exposición, la forma de aplicar primeros auxilios y la forma adecuada de desecho. Si existen reactivos que se repitan en diferentes prácticas, deberá escribir esta información cada vez que éste se repita.	5
Principio de la prueba	Se describirá el principio inmunológico en el que se basa la reacción realizada durante la prueba de laboratorio	
Tablas de resultados y dibujo de observaciones	Se realizarán las tablas que contengan la información generada durante la práctica, así como los dibujos que se consideren necesarios. Estos resultados servirán para realizar el informe de laboratorio. Para poderse retirar el alumno deberá presentarlos, y serán sellados por el instructor	
Presentación	Se calificará el orden, legibilidad de la escritura, limpieza y que el cuaderno esté al día.	---
Nota total del cuaderno de laboratorio		20 pts



NOTA: No puede usarse el mismo cuaderno de laboratorio para dos cursos simultáneos.

Debe escribir con lapicero azul o negro y con letra legible, los dibujos deben de pintarse y describirse según se indique en cada práctica.

El cuaderno se calificará al iniciar cada práctica de laboratorio.

2. DESARROLLO DE LA PRÁCTICA DE LABORATORIO

Antes de poder realizar cualquier trabajo dentro del laboratorio, el estudiante deberá demostrar fehacientemente que tiene el conocimiento necesario para poder llevar a cabo la práctica. Para ello se realizará un examen corto al inicio de cada práctica. El examen corto será sobre el contenido de la práctica y tendrá un valor de 30 puntos.

Durante el desarrollo de la práctica el docente evaluará los siguientes aspectos: atención, orden, limpieza y capacidad y disposición para seguir instrucciones. Las faltas graves, especialmente las que puedan poner en riesgo la salud y seguridad de los demás, puede ameritar el retiro temporal o definitivo de un estudiante, teniendo cero en la práctica completa.

Toda expulsión del laboratorio es contada como inasistencia, aunque el estudiante ya haya firmado la lista de asistencia.

3. REPORTE DE LABORATORIO

La principal forma de evaluación del trabajo hecho durante el laboratorio, así como la comprensión obtenida después de realizada la práctica, es el reporte de laboratorio. En él se evidencia el nivel de comprensión y la calidad de trabajo realizado por el estudiante.

Es necesario que muestre tanto una buena redacción como una buena ortografía. Como futuros profesionales de las ciencias médicas, es importante que los estudiantes ejerciten y mejoren su habilidad de redacción de informes, ya que es parte de la formación de todo profesional.

Generalidades para presentar el Reporte:

- Hojas tamaño carta impresas en dúplex
- Letra tipo Arial, tamaño 11 a espacio cerrado (1,0)



El reporte de laboratorio incluye las siguientes secciones:

Sección	Contenido	Valor (pts)						
Encabezado	<p>Debe mostrar toda la información de identificación del estudiante y de la práctica.</p> <table border="1"><tr><td>REPORTE No. X</td><td>Fecha de entrega</td></tr><tr><td colspan="2">NOMBRE DE LA PRÁCTICA</td></tr><tr><td colspan="2">Nombre y Apellido, carné, sección y número de puesto.</td></tr></table>	REPORTE No. X	Fecha de entrega	NOMBRE DE LA PRÁCTICA		Nombre y Apellido, carné, sección y número de puesto.		---
REPORTE No. X	Fecha de entrega							
NOMBRE DE LA PRÁCTICA								
Nombre y Apellido, carné, sección y número de puesto.								
Resumen	Debe expresar en forma clara y breve los objetivos, así como los resultados y conclusiones más importantes de la práctica, deberá redactarse en tiempo pasado e impersonal. Máximo 10 líneas.	5						
Marco Teórico	Se deberá buscar información relacionada al tema de la práctica, el cual servirá también para reforzar el conocimiento adquirido durante la misma. Deberá de tener por lo menos dos páginas y no exceder de tres.	5						
Resultados	Se solicita que esta sección se presente en cuadros tabulados de fácil lectura, a manera que la interpretación sea de fácil entendimiento para cualquier otra persona que no haya estado en el desarrollo de la práctica. Cada cuadro debe tener número, título que lo describa y fuente de donde se obtuvo la información. NO se aceptan datos, cálculos y resultados escritos a mano. De presentarlos así, se calificará con un cero esa sección. En el caso de realizar dibujos estos deben de estar descritos, pintados y señalados en caso de que en cada uno hayan distintas estructuras	10						
Discusión de Resultados	Es un análisis e interpretación de los resultados obtenidos, contrastando con lo descrito en la teoría. El estudiante puede poner en práctica el aprendizaje que haya obtenido. Debe explicar su experimento en base al principio químico estudiado, utilizando un lenguaje técnico-científico y redacción adecuada. Además, debe discutir sobre las posibles fuentes de error involucradas en la práctica y posibles formas de mejorar la ejecución y rendimiento de la misma.	10						
Conclusiones	Responden a los objetivos y se derivan de los resultados obtenidos, no deben ser muy extensas. Como regla, no se puede concluir teoría ni aspectos que no hayan sido incluidos en la discusión. Deberán colocar por lo menos 3 conclusiones	10						



Cuestionario	Responder las interrogantes planteadas al final de cada práctica en el manual de laboratorio.	5
Referencias	Presentar según los lineamientos del curso de Metodología de la Investigación.	5
Nota total del reporte de laboratorio		50

NOTA: Algunas secciones no tienen valor asignado, ya que su presencia no agrega puntos, sin embargo su ausencia sí resta puntos de la nota del reporte de laboratorio. Los estudiantes que no lleguen al día de la lectura de los cultivos, NO podrán entregar reporte, aunque hayan elaborado otras partes de la práctica.

OBSERVACIONES IMPORTANTES

- El reporte de laboratorio debe ser entregado en el periodo de laboratorio de la siguiente práctica.
- No se calificarán reportes sin nombre.
- No se recibirán reportes parcial o totalmente escritos **A MANO**.
- No se recibirán reportes tardíos ni en formatos electrónicos (correo electrónico o traslado por USB).
- El reporte debe entregarse engrapado (no clips).
- Toda aquella persona que se haya ausentado o haya sido retirada por cualquier motivo de una práctica, **NO TIENE DERECHO** a entregar el informe respectivo, sin importar si la falta haya sido justificada. Sin embargo, esto no quiere decir que el alumno se libere de la evaluación del tema de la práctica durante las pruebas parciales y final del laboratorio.

Los reportes se corregirán y devolverán en la semana siguiente a la entrega del mismo. Si algún alumno tiene cualquier duda o reclamo sobre la forma en que se ha calificado su reporte, debe hablar con su instructor **DENTRO DE LA PRIMERA SEMANA** después de haberlo recibido corregido **NO AL FINAL DEL SEMESTRE**. No se aceptarán reclamos posteriores.

IMPORTANTE:

Se tomará como falta grave (nota 0) cualquier indicio de plagio:

- Reproducción no autorizada de una publicación, palabra por palabra, incluyendo internet),
- Copia total o parcial del contenido del reporte por parte de dos o más alumnos (la sanción aplica a todos los estudiantes involucrados). Todo caso quedará documentado, y una reincidencia puede significar el retiro definitivo del laboratorio.

DISTRIBUCIÓN DE LA ZONA DE LABORATORIO



Rubro a evaluar	Punteo
Prácticas de laboratorio y hojas de trabajo	15
Examen final de laboratorio (incluye todo el contenido estudiado en el laboratorio)	5
Trabajo en grupo sobre inmunopatología y diagnóstico de enfermedades inmunes	5
Total nota de Laboratorio	25

-

Rubro a evaluar por práctica	Punteo neto	Porcentaje
Examen Corto	0.30	30 %
Cuaderno	0.20	20 %
Reporte	0.50	50 %
Total Práctica Individual	1.00	100 %



CALENDARIZACIÓN DE PRÁCTICAS

No.	Nombre	Fecha
0.	Información general	2 y 4 de julio
1.	Bioseguridad y buenas prácticas en el laboratorio	9 y 11 de julio
2.	Venopunción y manejo de especímenes hematológicos	16 y 18 de julio
3.	Células sanguíneas. Observación microscópica de la sangre. Evaluación hematológica	23 y 25 de julio
4.	Inmunodifusión	30 de julio y 1 de agosto
5.	Reacciones de precipitación	6 y 8 de agosto
	Primeros exámenes parciales	12-17 de agosto
6.	Reacciones de aglutinación	20 y 22 de agosto
7.	Reacciones de hemaglutinación (grupo sanguíneo y Rh)	27 y 29 de agosto
8.	Hemaglutinación pasiva	3 y 5 de septiembre
9.	Inmunocromatografía	10 y 12 de septiembre
10.	Ensayos inmunoenzimáticos (ELISA)	17 y 19 de septiembre
11.	Presentaciones: Inmunología de enfermedad reumática	24y 26de septiembre
12.	Presentación: Inmunología de lupus	24y 26 de septiembre
13.	Presentaciones: Inmunología de enfermedades neurológicas autoinmunes	1 y 3 de octubre
	Segundos exámenes parciales	7-12 de octubre
14.	Presentación: Inmunología del cáncer	15y 17 de octubre
15.	Presentación: Enfermedad tiroidea	22 y 24 de octubre
16.	Presentaciones: Inmunodeficiencia (VIH/SIDA)	28 y 30 de octubre
17.	Examen final de laboratorio	5 y 7 de noviembre



INDICE

	Página
Practica 1. Bioseguridad	11
Practica 2. Venipunción y manejo de especímenes hematológicos	16
Practica 3. Células sanguíneas	27
Practica 4. Inmunodifusión radial	35
Practica 5. Reacciones de Precipitación	41
Practica 6. Reacciones de Aglutinación	44
Practica 7. Reacciones de Hemaglutinación directa e indirecta	48
Practica 8. Hemaglutinación pasiva	53
Practica 9. Inmunocromatografía	57
Practica 10. Ensayo inmunoenzimáticos (ELISA)	60



NORMAS DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Practica 1

1. Introducción

Las siguientes son las prácticas generales requeridas para todo laboratorio que maneja sustancias infecciosas.

- a. Deberá estar disponible un manual de procedimientos específicos (de seguridad) en el laboratorio para todo el personal que trabaje en él. Todos sus requerimientos deberán ser seguidos, el mismo estará documentado y será revisado y actualizado con regularidad. Deberá estar colocado en un lugar accesible para todos y será firmado por todo el personal.
- b. El personal debe recibir entrenamiento sobre todos los potenciales peligros asociados con el trabajo, así como sobre las precauciones necesarias para prevenir la exposición a agentes infecciosos y la disposición y descarte de materiales. El personal debe mostrar evidencia de que ha entendido las instrucciones dadas en el entrenamiento, el cual deberá ser documentado y firmado por el personal y por el supervisor; deberán también implementarse programas continuos de entrenamiento.
- c. No está permitido comer, beber, fumar, guardar cualquier tipo de alimentos, pertenencias personales o utensilios. Está prohibido maquillarse, colocarse o removerse lentes de contacto. El uso de lentes de contacto está permitido solamente cuando no hay otra opción. El uso de joyas y accesorios no es recomendado en el laboratorio.
- d. Está prohibido pipetear con la boca cualquier sustancia.
- e. El cabello largo debe estar atado atrás o arreglado de manera que no entre en contacto con las manos, con las muestras, con los contenedores ni con el equipo.
- f. El acceso al laboratorio y áreas de apoyo está limitado a personal autorizado. No se admiten niños.
- g. Las heridas abiertas, cortadas, rasguños y abrasiones deben estar cubiertos con materiales a prueba de agua.
- h. Los laboratorios deben mantenerse limpios. El almacenamiento de materiales que no son pertinentes al trabajo y que no puedan ser fácilmente descontaminados (por ejemplo revistas, libros, correspondencia), debe ser minimizado; el trabajo de papelería y escritura de reportes debe estar aparte de las áreas de trabajo con material infeccioso.
- i. Deberá usarse ropa protectora, apropiadamente cerrada, por todo el personal, incluyendo visitantes, estudiantes y todas las personas que entren o trabajen en el laboratorio. Deberá usarse zapato cerrado y con tacones adecuados en todas las áreas de laboratorio. La bata del laboratorio “debe” ser usada siempre.
- j. Cuando se sabe de un riesgo potencial de exposición a salpicaduras y otros objetos, ya sea durante las operaciones de rutina o bajo circunstancias especiales (ej. Accidentes), debe usarse protección de los ojos y la cara. Debe tenerse



- cuidadosa consideración para identificar los procedimientos que requieran protección de ojos y cara.
- k. Para todos los procedimientos que involucren contacto directo con la piel y material biológico o animales infectados, deben usarse guantes (de látex, vinilo u otro co-polímero). Estos deberán ser removidos antes de abandonar el laboratorio y descartados.
 - l. La ropa protectora (bata) no debe ser usada en las áreas que no son de laboratorio (pasillos, biblioteca, etc.).
 - m. Si existe sospecha o certeza de exposición, la ropa contaminada debe ser descontaminada antes de lavarla.
 - n. El uso de agujas, jeringas y otros objetos punzo-cortantes debe estar estrictamente limitado; las agujas y jeringas deben ser usadas sólo para la inyección parenteral y aspiración de fluidos de animales de laboratorio. Debe tenerse especial cuidado cuando se usan agujas y jeringas para evitar auto-inoculación y generación de aerosoles durante su uso y descarte. Las agujas no deben ser dobladas, cortadas, tapadas o removidas de las jeringas; deben ser colocadas rápidamente en un contenedor resistente de punzo-cortantes para su descarte.
 - o. Las manos deben ser lavadas después que se han quitado los guantes y antes de dejar el laboratorio, así como en cualquier momento después de manipular material conocido o sospechoso de estar contaminado.
 - p. Las superficies de trabajo deben estar limpias y descontaminadas con un desinfectante adecuado (etanol 70%) al final del trabajo y después de cualquier salpicadura de material potencialmente infeccioso. No usar cloro en las campanas, excepto en caso de algún derrame. Es altamente corrosivo.
 - q. Si algún material o equipo debe salir del laboratorio para servicio de mantenimiento o para descarte, debe ser apropiadamente descontaminado y etiquetado como tal. Es responsabilidad del operador autoclavear y descartar todo desecho potencialmente peligroso.
 - r. Debe realizarse regularmente un monitoreo de las autoclaves usadas para descontaminar, usando indicadores biológicos y todos los resultados deben ser archivados.
 - s. Todo material contaminado, sólido o líquido, debe ser descontaminado antes de descartarlo o de reusarlo.
 - t. Todo el tiempo deben estar disponibles los desinfectantes efectivos dentro de las áreas en donde se manipula o se almacena material infeccioso.
 - u. Para el transporte de materiales infecciosos dentro de las instalaciones, deberán usarse contenedores a prueba de derrames.
 - v. Las salpicaduras, accidentes o exposiciones a materiales infecciosos, deben ser reportados inmediatamente al supervisor del laboratorio. Deben mantenerse registros escritos de tales incidentes dentro del Departamento, y los resultados de las investigaciones de tales incidentes deben ser usados para educación continua.
 - w. Debe mantenerse un programa efectivo de control de insectos y roedores.



2. Objetivo General

En esta práctica el estudiante aprenderá las normas de bioseguridad aplicadas al laboratorio de inmunología.

3. Objetivos Específicos

Que el estudiante:

- Se familiarice las normas de bioseguridad en el laboratorio de inmunología
- Conozca la importancia de los riesgos biológicos del manejo de material infeccioso
- Aplique sus conocimientos en la resolución de casos de accidente ocupacional con material infeccioso

4. Procedimiento

Revise literatura sobre bioseguridad en el laboratorio y esuelva los siguientes casos de accidente ocupacional:

CASO No. 1

Edad: 34 años

Sexo: femenino

Profesión: técnico de laboratorio

Evento: Manipulación de tubo de ensayo para procedimiento de valores sanguíneos

Situación: Ruptura de tubo de ensayo que provocó herida del dedo medio de la mano derecha en contacto con sangre de paciente VIH positivo, se desconoce valores de CD4 y carga viral.

¿Cuál es el riesgo para el técnico de laboratorio al entrar en contacto con la sangre del paciente?

¿Qué medidas de intervención se le deben de realizársele al técnico de laboratorio?

¿Qué medidas de protección y prevención que debió utilizar el técnico para disminuir el riesgo de contacto con el material infeccioso?

CASO No. 2

Edad 27 años

Sexo. Femenino

Profesión: Médico

Evento: colocación de sonda nasogástrica a con tuberculosis pulmonar, con franca hemoptisis y hematemesis.



Situación: hemoptisis y hematemesis activa durante el procedimiento de colocación de la sonda que contamina la conjuntiva del médico.

¿Cuál es el riesgo para el médico al entrar en contacto con los fluidos del paciente?

¿Qué medidas de intervención se le deben de realizársele al médico?

¿Qué medidas de protección y prevención que debió utilizar el médico para disminuir el riesgo de contacto con el material infeccioso?

CASO No. 3

Edad: 42 años

Sexo: masculino

Profesión: médico

Evento: punción del ganglio cervical en paciente VIH positivo en fase de SIDA,

Situación: realiza procedimiento de obtención de muestra y al separar la aguja de la jeringuilla el protector se separa y se introduce profundamente en el pulgar de la mano derecha

¿Cuál es el riesgo para el médico al entrar en contacto con los fluidos del paciente?

¿Qué medidas de intervención se le deben realizar al médico?

¿Qué medidas de protección y prevención que debió utilizar el médico para disminuir el riesgo de contacto con el material infeccioso?

CASO No. 4

Edad: 22 años

Sexo: masculino

Profesión: estudiante de medicina

Evento: preparación de pipetas de Westergreen para la evaluación de velocidad de sedimentación

Situación: realiza procedimiento de llenado de la pipeta, sin embargo el estudiante NO utiliza un pipetor y lo hace con la boca. La sangre entra en contacto con su boca.

¿Cuál es el riesgo para el estudiante al entrar en contacto con los sangre del paciente?

¿Qué medidas de intervención se le deben de realizársele al estudiante?

¿Qué medidas de protección y prevención que debió utilizar el estudiante para disminuir el riesgo de contacto con el material infeccioso?

CASO No. 5

Edad: 19 años

Sexo: femenino



Profesión: estudiante del curso de Inmunología

Evento: preparación de reactivos para la elaboración de agua regia (Ácido clorhídrico y ácido nítrico, proporción 3:1)

Situación: al realizar la mezcla de suero y reactivo el estudiante deja caer sobre la mesa de trabajo gotas de los mismos y no se da cuenta de ello. Posteriormente pone el antebrazo sobre el líquido derramado.

¿Cuál es el riesgo para el estudiante al entrar en contacto con el suero y reactivos?

¿Qué medidas de intervención se le deben de realizarse al estudiante?

¿Qué medidas de protección y prevención que debió utilizar el estudiante para disminuir el riesgo de contacto con el material infeccioso?

CASO No. 6

Evalúe la bioseguridad en el laboratorio de inmunología, haciendo énfasis en los cuidados que se debe de tener para mantener un ambiente seguro para las personas que trabajen en él, incluya:

- Descarte de material bioinfeccioso
- Limpieza del área de trabajo
- Lavado de cristalería
- Lavado de manos

5. Referencia

Laboratory Biosafety Guidelines. 2004. 3rd edition. Published by the authority of the Minister of Health Population and Public Health Branch, Centre for Emergency Preparedness and Response, Government of Canada. Pp. 19-23.



VENIPUNCIÓN Y MANEJO DE ESPECÍMENES HEMATOLÓGICOS

Práctica 2

1. Introducción

Las venas de un paciente constituyen la principal fuente de especímenes para análisis de laboratorio, como punto de entrada de medicamentos, así como el sitio ideal para transfusiones sanguíneas y/o procedimientos intravenosos. El proceso mediante el cual la sangre es removida de la vena es conocido como venipuntura o flebotomía.

La importancia de la flebotomía reside en que es el primer contacto entre el laboratorio y sus pacientes, mientras que desde el punto de vista de la muestra, un proceso cuidadoso conlleva una muestra apropiadamente colectada, así como la garantía de la seguridad de su origen y el correcto envasado y transporte, factores necesarios para la correcta evaluación e informe de los exámenes a realizar.

La toma de muestra de sangre para análisis de laboratorio se puede realizar mediante las siguientes técnicas: venosa o periférica y capilar. Para la mayoría de los exámenes clínicos, incluyendo hemogramas y dosificación de hemoglobina, se recomienda utilizar sangre venosa, mientras que para las fórmulas leucocitarias o frotos periféricos puede extraerse sangre en el lóbulo de la oreja o de la yema de un dedo. En los casos de niños, se recomienda utilizar la yema del dedo gordo del pie o del talón.

2. Objetivos

Que el estudiante:

- Se familiarice con el equipo utilizado para la extracción de sangre.
- Realice la extracción de sangre venosa utilizando jeringa o equipo vacutainer.
- Conozca la importancia de realizar correctamente este procedimiento.

3. Alcance

En esta práctica el estudiante aprenderá el procedimiento correcto de extracción de sangre venosa.

4. Antecedentes

REQUERIMIENTOS PREVIOS A LA VENIPUNTURA

4.1 Orden médica

Una solicitud médica debe acompañar cada muestra admitida dentro del laboratorio. Dicho documento debe contener la información apropiada para el correcto procesamiento de la muestra. Los elementos esenciales de una orden médica son:

- Nombre del paciente



- Número de identificación del paciente y/o número de historia clínica
- Género y edad del paciente
- Nombre completo del médico solicitante
- a) Análisis requeridos

4.2 Equipo necesario para la venipunción

El siguiente equipo es necesario para la venipuntura de rutina:

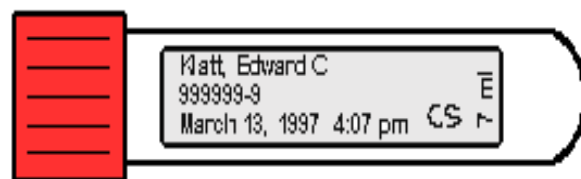
- Equipo Vacutainer®
 - o Tubos de vacío: Estos dispositivos están diseñados para llenarse con un volumen predeterminado de sangre por medio de vacío, esto garantiza una adecuada relación entre sangre y anticoagulante. Los tapones de goma están codificados por color de acuerdo con el aditivo que contienen así por ejemplo, los tubos morados (EDTA) son los más utilizados para hematología rutinaria y los tubos celestes (citrato) para pruebas de coagulación.
 - o Agujas especiales para adaptador.
 - o Adaptador para tubos de vacío.
- Jeringuillas de 3, 5 y 10 cc.
- Agujas: Están numeradas dependiendo de su calibre. Para colección de sangre para hemogramas, se recomienda una aguja de diámetro de 0.8mm (21G) para evitar daño a las células. Las agujas de 0.9-1.1mm de diámetro (20G-19G) se utilizan normalmente para punción venosa en adultos.
- Torniquete: Generalmente una liga plana de látex.
- Alcohol: Etilico o isopropílico al 70%.
- Algodón
- Gasas y/o vendas adhesivas
- Dispensador de agujas



4.3 Etiquetado de los tubos

Un adecuado etiquetado de los tubos es esencial para que los resultados de los análisis concuerden con el paciente correcto. Los elementos clave en el etiquetado para garantizar la calidad de la muestra pre-analítica son:

- Nombre o iniciales del paciente
- Número de identificación del paciente
- Fecha y hora de la toma de muestra
- Iniciales del flebotomista





PUNCIÓN VENOSA

Fundamento teórico

La punción venosa permite extraer una mayor cantidad de sangre para las pruebas necesarias en hematología. Las venas de elección suelen ser las de la cara anterior del antebrazo (vena cubital, vena cefálica y la vena basílica) porque resulta fácil acceder a ellas. Las cifras hemáticas permanecen constantes no obstante el sitio seleccionado para obtener la punción venosa.

Preparación del paciente

- Instruya al paciente sobre la técnica para tomar la muestra. Valore la existencia de problemas hemorrágicos o de circulación, o alergias en látex.
- Evite puncionar en un área con hematoma, fístulas, quemaduras, escoriaciones de la piel, cicatrices o del costado en que se ha realizado mastectomía reciente.
- Evite puncionar en el brazo donde hay venoclisis, inyección intramuscular previa o administración de medicamentos vía intravenosa.
- Avisar al paciente que al introducir la aguja sentirá dolor.
- Extienda completamente el brazo con la superficie palmar hacia arriba. Solicite ayuda del paciente, si éste está consciente, para realizar palanca con el brazo libre.
- Si existen dificultades para extraer la muestra, se entibia la extremidad con masajes. Se debe permitir que la extremidad permanezca inclinada durante varios minutos antes de realizar la punción. Si el paciente no tiene pruebas de glucosa o electrolitos, favorecer el ejercicio **leve** del brazo.

Metodología

Precauciones generales

- Durante la toma de muestra deben guardarse las más estrictas normas de higiene. Practique las precauciones universales mínimas con todo paciente a ser atendido. Toda muestra debe ser considerada potencialmente infecciosa y se deben tomar las precauciones que garanticen la seguridad del flebotomista y de los pacientes.
- El material descartable a usar se abrirá sólo al momento de su utilización y, una vez manipulado, no podrá guardarse nuevamente aún cuando se le considere nuevo.
 - o Tome precauciones al manipular agujas y/o lancetas.
 - o No deje agujas y/o lancetas usadas en la mesa de trabajo.
 - o No coloque el protector a la aguja.
 - o Evite que los niños toquen o jueguen con los equipos de flebotomía.
- Una vez realizada la toma de muestra, descartar inmediatamente los materiales usados en recipientes para ese fin.
- Los recipientes que contienen algodón y los de desecho deben estar perfectamente cerrados todo el tiempo y se abrirán solamente al momento de usar.

- Al momento de hacer la extracción colocarse los guantes desechables, los cuales se mantendrán puestos durante todo el procedimiento.
- Si ocurre un pinchazo accidental, informar inmediatamente al jefe de laboratorio. Mantenga la calma, y lávese inmediatamente con agua, jabón y alcohol. Favorezca la salida de sangre por presión continua.



Procedimiento en adultos

- Identifique correctamente al paciente. Prepárelo correctamente para la extracción.
- Coloque un torniquete en la parte superior del brazo (aproximadamente 5 cm por encima del pliegue) para producir congestión venosa. El torniquete prolongado causa estasis y hemo-concentración. El lazo debe ser colocado de modo de producir una compresión del músculo no mayor a 1 mm.
- Seleccione el sitio de la punción: Pida al paciente que abra y cierre el puño varias veces; escoja una vena accesible.
- Limpie el sitio de la punción, previo a puncionar debe estar seco. Debe tener presente que una vez realizada la decontaminación, no debe volver a tocar el área venosa.
- Para realizar la punción el paciente debe tener el puño cerrado.
- Coloque la punta de la aguja en un ángulo de 15-30° sobre la superficie de la vena escogida y atravesese la piel con un movimiento firme y seguro, hasta el lumen de la vena.
- Una vez que penetra en la vena, la sangre llena los tubos aspiradores automáticamente por la presión negativa dentro del tubo en el caso de Vacutainer®, mientras que con jeringas se debe jalar el émbolo con movimiento continuo para extraer la sangre hasta el volumen requerido. Evite presionar fuertemente la aguja durante la extracción.
- Solicite al paciente que abra el puño y afloje el torniquete para que la sangre fluya mejor y remueva la aguja del brazo con movimiento suave al terminar de colectar, sin apretar el área de la punción con el algodón. Presione el algodón sobre el sitio de la



punción aplicando una presión adecuada y no excesiva para evitar la formación de hematoma.

- Descartar las agujas y/o jeringuillas en un contenedor apropiado.

Procedimiento en niños

- En niños mayores de 6 meses, se recomienda hacer la extracción del brazo como en adultos, pidiéndole a un adulto que colabore en mantener inmóvil al niño, en particular el brazo.
- En el caso de niños menores de 6 meses, se procederá a extraer la muestra del talón con una lanceta descartable. Antes de la extracción conviene calentar el talón frotándolo entre las manos para favorecer la irrigación de la zona.
- Desinfectar con un trozo de algodón embebido en alcohol, dejar evaporar y punzar con la lanceta en la zona lateral del talón.
- Limpiar la primera gota y dejar gotear la sangre en el tubo con anticoagulante.
- Secar la zona con un trozo de algodón seco y una vez que no haya sangrado, colocar una curita o apósito.



PUNCIÓN CAPILAR

Fundamento teórico

Es utilizada para extraer pequeñas cantidades de sangre para determinaciones de hemoglobina, hematocrito y frotos periféricos. Hay tres lugares de donde realizar esta punción: el lóbulo de la oreja, la yema del dedo y el talón del pie.

Metodología

- Tome la muestra de las yemas de los dedos o lóbulo de la oreja (adultos); del dedo pulgar del pie o del tobillo (en lactantes o niños menores de 6 meses).
- Desinfecte el sitio de la punción, séquelo y puncione la piel con una lanceta estéril que no debe penetrar más de 2 mm.
- Deseche la primera gota de sangre. Tome las gotas subsecuentes en un microtubo y prepare las laminillas con esa muestra.

Recomendaciones:

No oprima el sitio de la punción para obtener sangre porque se altera la composición hemática o invalida los resultados.

Muchas veces se facilita la toma e muestra si se calienta la extremidad o se coloca en postura colgante.



Cuidados del paciente después de la punción:

Aplique una pequeña curación o cinta adhesiva sobre el sitio de la punción, si bien hay que verificar presencia de hemorragia. De haberla, presione; en caso de que persista el sangrado, busque en los antecedentes del paciente si ha sido sometido a un tratamiento con anticoagulantes (aspirina) y/o antecedentes de alteraciones en la circulación o coagulación.

CONSIDERACIONES ADICIONALES PARA LA BUENA CALIDAD DE LA EXTRACCIÓN DE MUESTRA

Para prevenir la formación de hematoma

No puncionar directamente sobre la pared de la vena.

Remover el torniquete antes de retirar la aguja.

Sostener las venas superficiales al momento de la punción.

Asegurarse que la aguja penetre completamente hacia el lumen de la vena. La penetración parcial permite que la sangre escape hacia el tejido blando, rodeando la vena vía el bisel de la aguja.

Aplicar una presión adecuada en el sitio de la punción.

Para prevenir la hemólisis (principal interferente en muchas pruebas)

Mezclar los tubos con anticoagulante gentilmente (en forma de 8) de 15-20 veces.

Evite la extracción sanguínea directamente de un hematoma.

Evite la extracción forzada generada por el aspirado violento del émbolo, en el caso de jeringas. Evite la formación de espuma en la muestra.

Asegúrese que el sitio de venipunción esté seco.

Evite la venipunción traumática.

En tubos no llenados al vacío, puede ocurrir hemólisis al llenarlos cuando se hace una fuerte presión sobre el émbolo provocando un chorro de sangre violento.

La aplicación prolongada del torniquete conlleva...

A la hemo-concentración de elementos no filtrables (ej. proteínas). La presión hidrostática ocasiona que el agua y algunos elementos filtrables abandonen el espacio extracelular y se acumulen en la sangre. En algunos casos esto ocasiona serias interferencias en los análisis a efectuar.

Un aumento del volumen del paquete globular sanguíneo.

Alteraciones dentro de los parámetros evaluados en la química sanguínea.

GUÍA PARA LA RESOLUCIÓN DE PROBLEMAS DURANTE LA EXTRACCIÓN VENOSA

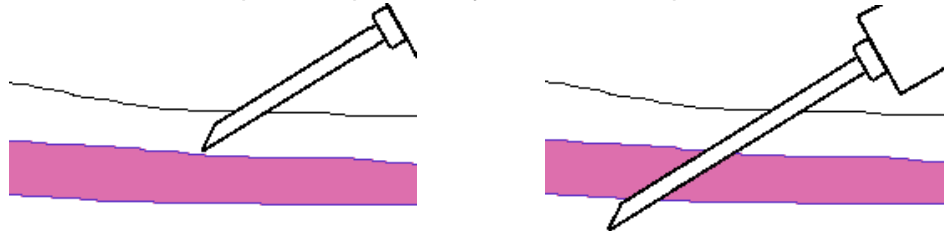
Si no se obtiene muestra sanguínea o la misma es incompleta...

Cambie la posición de la aguja. Un leve movimiento hacia delante (cuando hay menos de 2/3 de la aguja dentro de la piel), en el ángulo correcto ayuda. Es muy probable que no se encuentre en el lumen.

En caso de una penetración muy profunda (cuando hay más de 2/3 de la aguja dentro de la piel), un leve movimiento hacia atrás favorece la entrada al lumen venoso. Asegúrese que el ángulo sea el correcto.

En caso fallido, tome en cuenta lo siguiente:

- Afloje el torniquete. Este podría estar obstruyendo el flujo sanguíneo.
- Pruebe otro tubo. Es posible que no haya vacío en el que se está utilizando.



- Fije nuevamente la vena. Algunas veces las venas se mueven del sitio de la punción.

Si la sangre deja de fluir en el tubo...

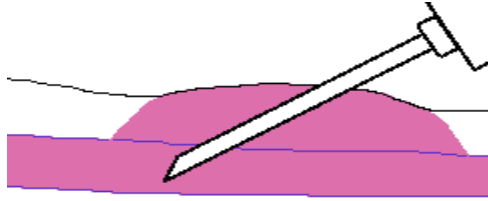
Es probable que la aguja se haya salido de la vena durante el recambio de tubos. Con movimientos gentiles, rediréccionela. Para evitar los anterior, mantenga el equipo firmemente sin ejercer una presión que cause molestias al paciente.

Es probable que la vena haya colapsado; afloje el torniquete para incrementar el flujo venoso, remueva la aguja ligeramente y vuelva a redireccionarla. Si esto no es exitoso, remueva la aguja, tenga los cuidados correspondientes en el sitio de la punción. Puncione nuevamente en un lugar diferente.

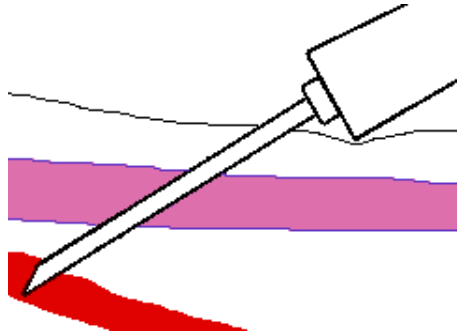


Otros problemas que deben considerarse...

Si se forma un hematoma bajo la piel adyacente al sitio de la punción, afloje el torniquete y retire la aguja. Aplique presión firmemente sobre el hematoma. Aconseje el uso de paños intermitentes de agua fría y caliente.



Pudiera suceder que se atravesara una arteria, en estos casos la sangre se observa de color rojo brillante. Afloje el torniquete, retire suavemente la aguja y aplique una presión uniforme y constante durante 5 minutos.



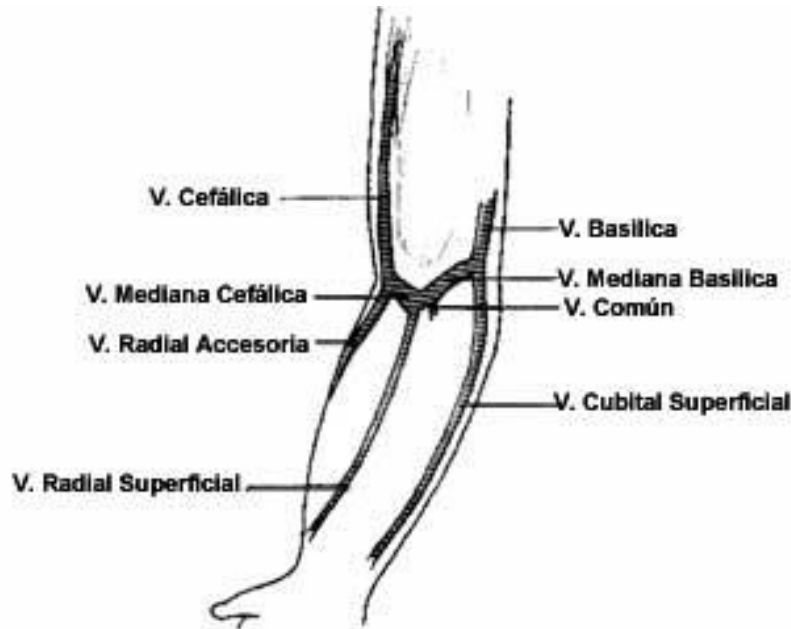
5. Materiales y equipo

- Algodón
- Etanol al 70%
- Ligadura
- Tubos vacutainer con anticoagulante EDTA
- Jeringas de 3 cc
- Descartador de punzocortantes
- Bolsas roja

6. Procedimiento

- Instruya al paciente sobre la técnica para tomar la muestra:
Coloque al paciente bien sentado con el brazo a puncionar extendido.
Busque la vena que va a puncionar visualmente, y luego con el dedo índice tóquela para ver su trayectoria.

Figura 1. Venas del antebrazo



- Coloque el torniquete haciendo un nudo moderadamente apretado en la parte superior del brazo donde va a hacer la punción
- Avisar al paciente que al introducir la aguja sentirá dolor.
- Extienda completamente el brazo con la superficie palmar hacia arriba. Solicite ayuda del paciente, si éste está consciente, para realizar palanca con el brazo libre.
- Si existen dificultades para extraer la muestra, se entibia la extremidad con masajes. Se debe permitir que la extremidad permanezca inclinada durante varios minutos antes de realizar la punción. Si el paciente no tiene pruebas de glucosa o electrolitos, favorecer el ejercicio **leve** del brazo.

7. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

Observar todas las normas de bioseguridad. Debe tomarse en cuenta que todo el tiempo se está trabajando con muestras potencialmente infectivas.

8. Formato de presentación de resultados

Entregue la hoja de trabajo del cuestionario escrita a mano, junto con su pareja de extracción

9. Cuestionario

- a. Describa brevemente el proceso de extracción



- b. ¿Cuál es el calibre de la aguja utilizada para el procedimiento de venipunción?
- c. ¿Por qué se utiliza una ligadura en el brazo para realizar la extracción sanguínea?
- d. ¿Por qué no se debe de realizar la extracción sanguínea en una vena muy delgada y cuál es la consecuencia de hacerlo?
- e. ¿Cuáles pueden ser las causas por la cual deja de salir sangre durante la extracción sanguínea?
- f. Mencione tres precauciones para evitar hemólisis de la muestra de sangre obtenida
- g. Mencione tres precauciones para evitar hematomas
- h. Como se debe de introducir el bisel de la aguja y ¿Por qué?
- i. Explique porqué no debe de pasarse la sangre de la jeringa al tubo sin quitar la aguja
- j. Mencione dos soluciones desinfectantes que se pueden utilizar, además del etanol al 70%
- k. Defina que es un anticoagulante
- l. Qué anticoagulante contienen cada uno de los tubos vacutainer que se identifican con los tapones de los siguientes colores
 - a. Celeste
 - b. Morado
 - c. Verde
 - d. Rojo
- m. ¿Qué ventajas tiene la utilización de mariposas para extraer sangre?
- n. ¿En qué se diferencia la sangre arterial de la sangre venosa?
- o. ¿Qué diferencia hay entre suero y plasma?
- p. ¿Qué ventaja tiene la extracción venosa sobre la capilar?
- q. Defina qué es un sistema de extracción tipo vacutainer, como funciona y qué se requiere para la extracción con vacutainer a diferencia de la extracción con jeringa
- r. ¿Qué diferencia hay entre venopunción y venociclis?
- s. ¿Qué hacer en caso de no tener vena visible para la extracción sanguínea?
- t. Que venas se pueden utilizar para realizar la flebotomía en el brazo

NOTA: coloque su bibliografía al final del cuestionario

10. Bibliografía

- William W., *et al.* Hematología. Barcelona: Salvat, 1979. x + 455p.
- Fink N., *et al.* Métodos del laboratorio hematológico. Primera parte. Argentina: Universidad Nacional de la Plata, 2005. 58p.
- Pérez JR., Fernández J. Manual de prácticas de laboratorio de hematología. 3 ed. Guatemala: Universidad de San Carlos, 1997. 102p.



Universidad Mariano Gálvez
Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud
Carrera de Médico y Cirujano

- Albarenga S., Córdoba C., Plazas L. Sangre. Mar de Plata: Escuela de Enfermería Hospital de la Comunidad, 2004. 11p.
- Phlebotomy. Disponible en URL:
<http://www.medlib.med.utah.edu/WebPath/TUTORIAL/>
- TUTORIAL.html#2 Fecha de consulta: Junio, 2006.



CÉLULAS SANGUÍNEAS

Práctica 3

1. Introducción

La fórmula leucocitaria tiene por objetivo determinar los porcentajes de las distintas clases de leucocitos normales y anormales en la sangre. A partir de los porcentajes puede incluso calcularse el número real de cada clase de leucocitos por mm^3 de sangre (valor absoluto), conociéndose el total de leucocitos.

Por ejemplo:

Si se tiene 60% de neutrófilos segmentados y el recuento total de leucocitos es de 20 000, entonces el valor absoluto de neutrófilos segmentados sería: $60/100 \times 20\ 000 = 12\ 000$.

Valores de referencia absolutos de neutrófilos segmentados = 3000 – 5000 por mm^3

Conclusión: Los valores relativos sólo nos sirven cuando los valores totales de leucocitos se encuentran dentro del valor normal. En caso contrario (leucocitosis o leucopenia) se debe emplear la fórmula para obtener el valor real, y así determinar que elemento celular se encuentra fuera del rango normal, sea elevado o disminuido.

2. Objetivos

- Conocer las células que conforman la sangre
- Identificar la morfología de cada una de los leucocitos presentes en la sangre
- Realizar una fórmula leucocitaria y conocer las distintas patologías donde hay alteración.

3. Alcance

Al final de la práctica el estudiante podrá identificar las distintas morfologías de los leucocitos presentes en la sangre, así como la aplicación de la realización de una fórmula leucocitaria y su importancia en el diagnóstico de determinadas patologías.

4. Antecedentes

4.1 Granulocitos

Aquellos que tienen gránulos específicos: neutrófilos, eosinófilos y basófilos. Los gránulos observados en extendido están cargados de lisosomas y enzimas hidrosolubles que son agentes antibacterianos necesarios para la digestión de partículas fagocitarias. Aquí tenemos:

4.1.1 Neutrófilos

4.1.1.1 Neutrófilos en cayado (Fig. 1)



Es el granulocito en banda. Mide de 10m a 14m, núcleo condensado que puede presentar una ó dos constricciones, pero no tiene puente de cromatina. El citoplasma presenta gránulos específicos e inespecíficos, membrana celular lisa, citoplasma de color ligeramente rosado dependiendo de la coloración.

4.1.1.2 Neutrófilos segmentados (Fig. 2)

Mide igualmente de 10m a 14m, núcleo que presenta mayor condensación y está formado por varios lóbulos (hasta 4) unidos por puentes de cromatina. El citoplasma está cargado de gránulos.

Alteraciones leucocitarias de los neutrófilos

• Granulaciones tóxicas (Fig. 3)

Son gránulos basófilos más oscuros que lo normal y se observan durante el transcurso de infecciones severas y estadios tóxicos.

• Vacuolas tóxicas (Fig. 4)

Se observan en el citoplasma de los neutrófilos durante infecciones severas y estados tóxicos.

• Cuerpos de Dohle (Fig. 5)

Son áreas teñidas de azul en el citoplasma de los polimorfonucleares neutrófilos y se encuentra en infecciones, especialmente en neumonías.

• Palillo de tambor (Fig. 6)

Es un pequeño apéndice (cromatina sexual) que permite conocer el sexo del individuo mediante una simple observación en un frotis de sangre periférica en los neutrófilos. Se presenta en las mujeres.

• Polisegmentación (Fig. 7)

Son neutrófilos con 5 o más lobulaciones. Se observa en las anemias por deficiencia de vitamina B-12 y ácido fólico, Síndrome de Down y otras anomalías.

Existe aumento en el número de neutrofilos (neutrofilia) en:

- Infecciones bacterianas por agentes piogénicos.
- Abscesos y septicemias.
- Procesos inflamatorios y necrosis tisular.
- Trastornos metabólicos por intoxicación.
- Procesos malignos: Carcinoma
- Hemorragias y hemólisis.
- Postesplenectomía.



Fig. 1 Neutrófilo en banda
Granulación tóxica
y neutrófilo segmentado

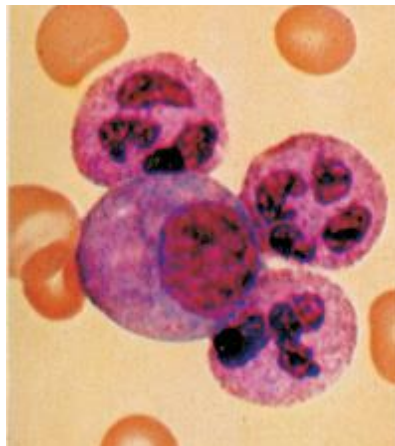


Fig. 2 Neutrófilos segmentados

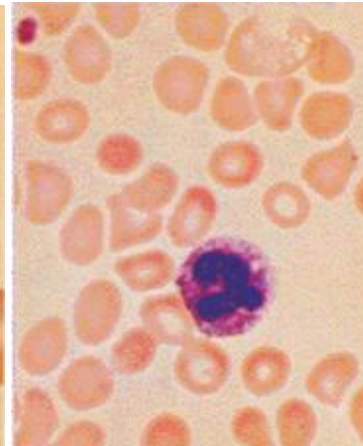


Fig. 3

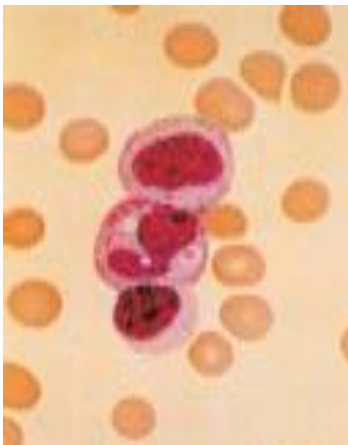


Fig. 4 Vacuolización del citoplasma
Fig. 6 Palillo de tambor

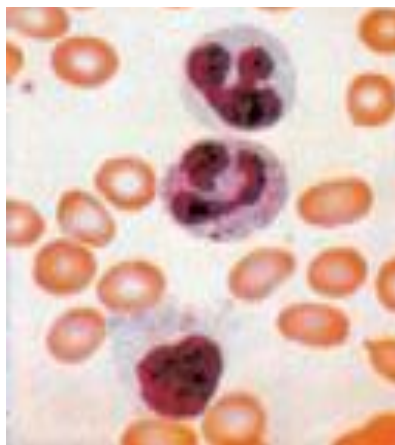


Fig. 5 Cuerpos de Dohle

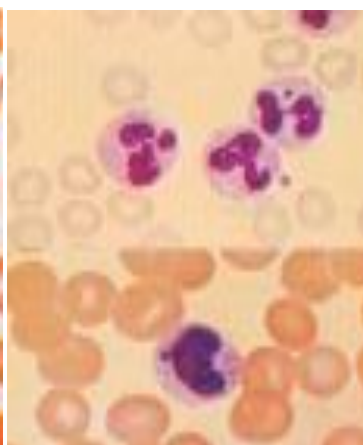


Fig. 7. Polisegmentación

Desviación a la izquierda: Significa el aumento de las formas inmaduras (en banda o cayado, y juveniles) dentro de los neutrófilos. Constituye un importante valor diagnóstico y pronóstico. Puede observarse en: infecciones e intoxicaciones.

Desviación a la derecha: Corresponde a la hipersegmentación nuclear. La mayoría de polimorfonucleares presenta más de 5 lobulaciones. Ocurre en:

- Anemia perniciosa.
- Hipersegmentación constitucional hereditaria.
- Reacciones mieloides de la sepsis.
- Afecciones hepáticas.
- Leucemia mieloide.
- En la agonía.

Existe disminución de neutrófilos (neutropenia) en:

- Aplasia medular
- Mieloptisis de la médula ósea
- Agentes citotóxicos
- Granulopoyesis inefectiva (anemias megaloblásticas).

4.1.2 Eosinófilos (Fig. 8)

Son parecidos a los neutrófilos, pero son algo mayores. Generalmente el núcleo es bilobulado y lo que más caracteriza a esta célula es la presencia de gránulos color naranja-marrón vistos claramente, muchas veces estos gránulos hacen que se pierda la membrana celular por el rompimiento de ésta, ya que estas células son muy frágiles.

Patología: Existe aumento de eosinófilos (eosinofilia) en:

- Infecciones parasitarias.
- Reacciones alérgicas.
- Enfermedades cutáneas.
- Neoplasias.

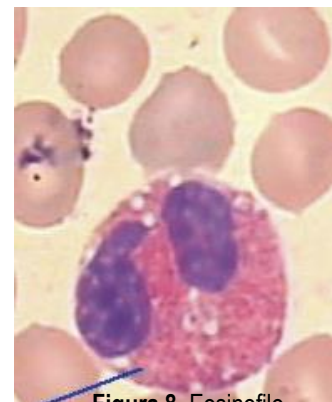


Figura 8. Eosinofilo

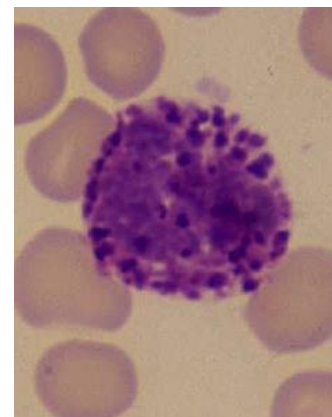


Figura 9. Basofilo

4.1.3 Basófilos (Fig. 9)

La característica más importante de esta célula es la cantidad de gránulos de color azul negruzco que se encuentra ocupando toda la célula (esto cuando la célula es madura) y parte de la célula cuando ésta es inmadura. Presenta un núcleo que muchas veces no logra observarse por la cantidad de gránulos que contienen histamina y heparina.

Patología: Existe aumento (basofilia) en Leucemia por basófilos.

4.2 Agranulocitos

No poseen gránulos. Aquí tenemos a los linfocitos y monocitos.

4.2.1 Linfocitos: Linfocitos grandes y linfocitos pequeños.

4.2.1.1 Linfocitos grandes (Fig. 10)

Miden de 15m a 25m, presentan generalmente un núcleo ligeramente oval discretamente indentado, la cromatina es densa pero no tanto como en el linfocito pequeño (esto lo puede confundir con el monocito). Citoplasma abundante, azul pálido y puede contener gránulos azurófilos inespecíficos.

4.2.1.2 Linfocitos atípicos (Fig. 11)

Llamados también virus linfocitos, células linfomonocitoides, células activadas de Turk, células de Turk, virocitos, inmunoblastos, etc. Miden de 15m a 30m, núcleo irregular, indentado, excéntrico y puede observarse nucleolos. El citoplasma es amplio, color azul tenue, y puede presentar gránulos azurófilos y vacuolas. Estas células pueden observarse en mononucleosis infecciosa, hepatitis viral, herpes zoster, enfermedades autoinmunes y normalmente pueden hallarse hasta en 5%.

4.2.1.3 Linfocitos con mitosis o binucleados (Fig. 12)

Pueden encontrarse en enfermedades virales.

4.2.1.4 Linfocitos vacuolados (Fig. 14)

En caso de linfocitos que reaccionan por efecto de la radiación ultravioleta o respuesta a tratamientos de quimioterapia.

4.2.1.5 Linfocitos pequeños (Fig. 10b)

Miden de 9m a 15m, presentan un núcleo que ocupa casi toda la célula, excéntrico, cromatina fuertemente densa. El citoplasma es escaso, basófilo y puede contener gránulos azurófilos inespecíficos.

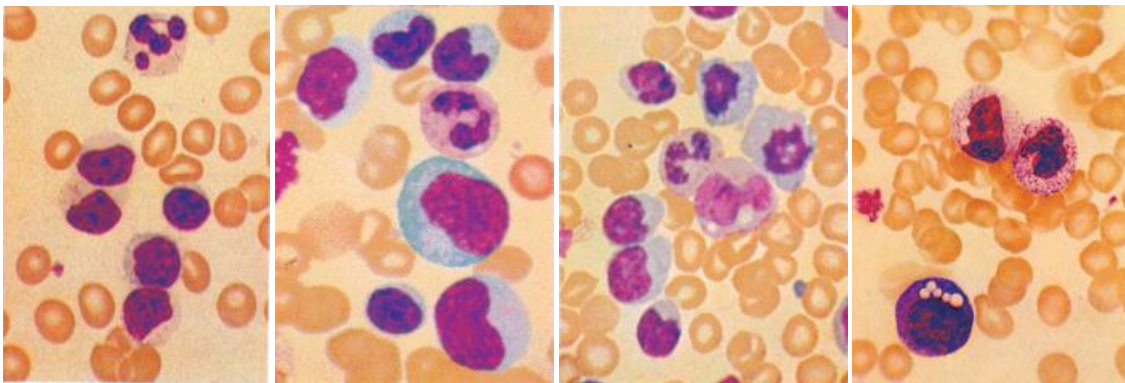


Figura 10. Linfocitos grandes y pequeños

Figura 11. Linfocitos atípicos

Figura 12. Linfocitos en mitosis

Figura 13. Linfocitos vacuolados

4.2.2 Monocitos (Fig. 14)

Son los leucocitos de mayor tamaño en la sangre (14µm a 20µm). Su núcleo es generalmente excéntrico, aunque puede ser central. Su cromatina nuclear es laxa, distribuida en forma regular, la forma del núcleo generalmente es de una madeja de lana o arriñonada, aunque puede tener forma de un abastonado. El citoplasma es de color gris y puede presentar gránulos inespecíficos (azurófilos) que carecen de significado clínico.

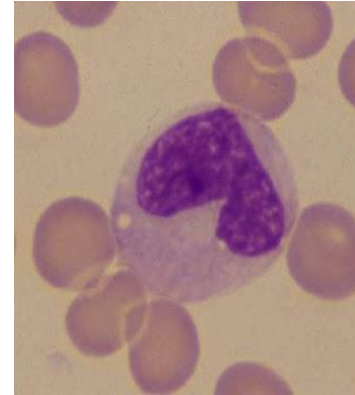


Figura 14. Monocito

Patología: Los monocitos están elevados en:

- Tuberculosis.
- Endocarditis bacteriana.
- Enfermedades virales como sarampión, rubéola, etc.
- Colagenosis, neoplasias, etc.

CRITERIOS PARA EL DESARROLLO DE UN LEUCOGRAMA

- Se considera leucocitosis cuando la cifra de glóbulos blancos excede de 10 000.
 - Se considera leucopenia cuando la cifra de glóbulos blancos es inferior a 5 000.
 - No olvidar que el ejercicio produce leucocitosis fisiológica de consideración, de allí que el recuento debe hacerse en condiciones basales.
 - En los granulocitos debe informarse el número de lobulaciones del núcleo. A mayor edad de la célula mayor el número de lóbulos y lo contrario.
- citoplasma

5. Materiales

- Aceite de inmersión
- Alcohol 70%
- Algodón
- Beaker con cloro al 5%
- Cloro 5%
- Colorante de Wright
- Laminas portaobjetos (3/A)
- Muestras de sangre
- Pizeta con agua de chorro
- Varillas para tinción



6. Procedimiento

- Preparar frotos sanguíneos utilizando para ello una gota de sangre sobre un portaobjetos limpio y desengrasado.
- Extender la gota de sangre con otro portaobjetos, procurando una capa fina de células
- Teñir los frotos con colorante de Wright durante 10 minutos.
- Agregar agua destilada hasta formar una capa tornasolada.
- Lavar.
- Limpiar los frotos con algodón y alcohol en la parte de abajo para quitar el exceso de colorante.
- Examinar la lámina a pequeño aumento para comprobar si los elementos celulares están bien distribuidos. Si es favorable se examina con el objetivo de inmersión.
- La parte ideal para visualizar células para la fórmula leucocitaria es en la parte final del cuerpo y comienzos de la cola, recorriendo la lámina de izquierda a derecha o de arriba hacia abajo hasta contar 100 leucocitos incluidos los agranulocitos y granulocitos. Aquí no se incluyen los elementos inmaduros de sangre roja.
- Anotar a medida que se va contando, el número de cada una de las clases de glóbulos blancos observados.
- Determinar luego los porcentajes de cada uno de ellos para luego comparar con los porcentajes normales.

LEUCOCITOS	Valores relativos (%)	Valores absolutos (%)
Neutrófilos segmentados	55-65	3000-5000
Neutrófilos en banda	3-5	150-400
Eosinófilos	0,5-4,0	20-350
Basófilos	0-0,5	10-60
Monocitos	4-8	100-500
Linfocitos	25-35	1500-400

7. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

Observar todas las normas de bioseguridad. Debe tomarse en cuenta que todo el tiempo se está trabajando con muestras potencialmente infectivas.

8. Formato de presentación de resultados

Entregar un informe completo de sus resultados.



9. Cuestionario

1. Indique las características de un frote sanguíneo bien preparado, dibuje
2. Realice un cuadro comparativo de las anomalías morfológicas que pueden observarse en los leucocitos diferenciando cada una de las células: Neutrófilos, eosinófilos, linfocitos, basófilos y monocitos y haciendo un dibujo de cada una de ellas
3. ¿Qué colorantes componen el reactivo de Wright, y que componentes celulares tiñe cada uno de ellos?
4. ¿Por qué se debe de agregar buffer o agua de chorro durante la tinción?
5. Si su paciente tiene un conteo total de leucocitos de 8,000 células/mm³ y 3500 eosinófilos/mm³ ¿Cuál es el valor relativo de eosinófilos, expresado en porcentaje? Deje constancia de sus cálculos matemáticos

INMUNODIFUSIÓN RADIAL

Precipitación I

Práctica 4

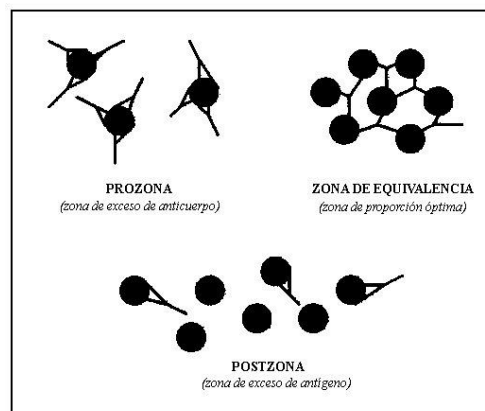
1. Introducción

El principio de la inmunodifusión es la precipitación, la cual consiste en la unión del antígeno con el anticuerpo estando ambos en solución, los cuales al unirse forman un complejo insoluble que precipita. Esta es una técnica que permite determinar cualitativa y cuantitativamente la concentración de un antígeno y que utiliza un soporte o matriz de agar en el que difunden Ag y Ac. Es un método sensible que es usado clínicamente para detectar niveles de proteínas plasmáticas. En la zona del agar en donde se establece el equilibrio entre las concentraciones de Ag y de Ac se observa una banda de precipitado. La difusión puede realizarse en una o dos dimensiones y además en tubo y en placa.

Las reacciones en geles fueron utilizadas primero para estudios inmunoquímicos a mediados de la década de 1940, cuando Oudin introdujo la inmunodifusión "simple" en una dimensión en tubos conteniendo gel de agar. El demostró que un sistema sencillo Ag-Ac daba lugar a una banda de precipitina y que la mezcla de sistemas en el mismo tubo daba bandas múltiples e independientes. Con estas observaciones, las reacciones de precipitina se desarrollaron tanto cualitativas como cuantitativas.

Los métodos en gel tienen significativamente mayor sensibilidad y mayor poder de resolución que las técnicas sin medio de soporte. Además, los geles actuales pueden ser fotografiados y almacenados, ya que los inmunoprecipitados insolubles que se forman en la zona de equivalencia, son atrapados permanentemente en la matriz del gel.

Muchas modificaciones han surgido después del método de difusión de Oudin y probablemente las más usadas sean la inmunodifusión doble y la inmunodifusión radial para estudios cualitativos y cuantitativos, respectivamente. La combinación de la electroforesis con la difusión ha resultado en métodos muy importantes, que serán tratados en otra práctica.



La difusión simple en agar se basa en la incorporación de un anticuerpo en agarosa fundida, la cual es vertida dentro de una caja de Petri la cual se deja solidificar. Se cortan pequeños pozos dentro de la agarosa y estos son llenados con concentraciones conocidas de antígeno correspondientes al anticuerpo, con el objeto de construir una curva de calibración. Las muestras desconocidas se colocan dentro de los pozos. Los antígenos en solución difundirán hacia fuera del pozo en un patrón circular rodeando al pozo. El anticuerpo está presente en exceso y la difusión del antígeno continuará hasta que se forme un precipitado antígeno-anticuerpo en forma de anillo estable.

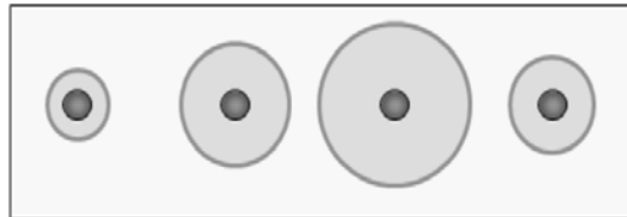
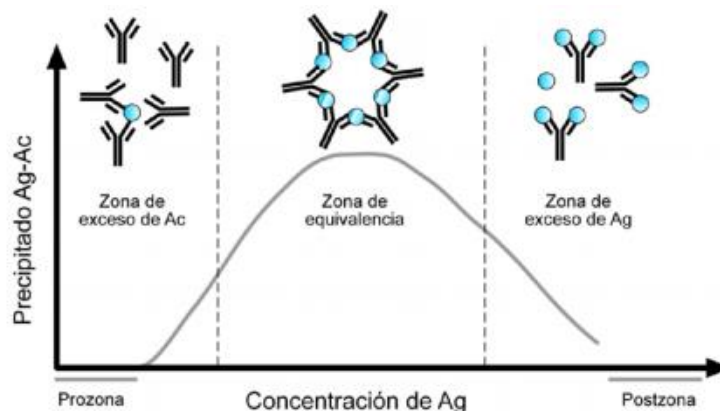


Figura 1. Inmunodifusión simple

Habrà complejo Ag-Ac en toda la zona circundante al pozo dentro de la línea de precipitina. En esta línea es donde está presente el mayor número de complejos, ya que en ese punto el antígeno y el anticuerpo están en proporciones iguales. Esta es conocida como la zona de equivalencia.



Generalmente toma de 24 a 48 horas para que ocurra la difusión óptima y la precipitación se haga evidente. Para cada antígeno, se formará una precipitación final en anillo de cierto diámetro. De las concentraciones conocidas estándar, se traza una curva de calibración, colocando en los ejes: concentración de antígeno vrs mediciones de diámetro cuadrado de los anillos. A partir de esta curva de calibración lineal, la presencia y cantidad de antígeno en las muestras desconocidas pueden ser determinadas.

2. Objetivos



- Comprender la naturaleza de la reacción antígeno-anticuerpo *in vitro*.
- Conocer los factores que intervienen en la reacción Ag-Ac y la forma en que afectan el resultado final.
- Conocer la diferencia entre la reacción primaria y las reacciones secundarias.
- Conocer los diferentes tipos de reacciones secundarias, sus ventajas, desventajas y sus aplicaciones.

3. Alcance

Al final de la práctica el estudiante podrá visualizar los tipos de reacción Ag-Ac *in vitro* que existen así como la aplicación de cada una de ellas de acuerdo a sus características individuales en el diagnóstico serológico.

4. Antecedentes

La reacción antígeno-anticuerpo (Ag-Ac) es una unión molecular entre el epitopo (antígeno) y la región hipervariable del anticuerpo, mediante interacciones no covalentes o secundarias. Estas uniones son débiles tales como: puentes de hidrógeno, fuerzas iónicas y fuerzas de van der Waals. Estas fuerzas sólo se convierten en agentes de unión efectivos cuando ocurren a distancias muy cercanas. Las interacciones hidrofóbicas intervienen también y constituyen el 50% de la fuerza total. De tal manera que debe ocurrir una combinación de moléculas complementarias entre el sitio de unión del anticuerpo y el determinante antigénico o epitopo. Mientras más se complementan las configuraciones moleculares, más uniones secundarias se forman entre el antígeno y el anticuerpo, y es más difícil que ese complejo sea alterado por fuerzas tales como la agitación térmica.

La asociación Ag-Ac está determinada por la ley de acción de masas, es reversible y está definida por una constante de equilibrio $K = \frac{AcAg}{(Ac)(Ag)}$.

La velocidad de la reacción depende de tres factores:

- afinidad,
- avidéz
- especificidad

Aunque estos dos términos a menudo son usados indistintamente, no son exactamente lo mismo. La avidéz se refiere a la fuerza de unión mostrada por los anticuerpos a un antígeno complejo (antígeno que contiene una variedad de epitopos), y la afinidad se refiere a la fuerza de unión entre el anticuerpo y un epitopo; es la suma de las fuerzas de atracción sobre las de repulsión.

En la unión Ag-Ac ocurren dos reacciones:

- La reacción primaria es la formación del complejo Ag-Ac
- La reacción secundaria es la evidencia de esos complejos mediante la observación de un fenómeno, el cual depende de la naturaleza del antígeno, las propiedades de los anticuerpos y la presencia de otros factores en el medio de reacción.



La mayor aplicación de estas reacciones *in vitro* son las pruebas serológicas. Son llamadas así porque es el suero el vehículo habitual de los anticuerpos. Sin embargo, pueden realizarse en otros fluidos corporales tales como plasma, orina o líquido cefalorraquídeo, en busca de antígenos o anticuerpos específicos.

Una prueba serológica para un antígeno específico idealmente es realizada usando un reactivo de anticuerpo monoespecífico (que contenga anticuerpos reactivos con una sola clase de epitopo). No siempre es posible obtener anticuerpos monoespecíficos, por lo que en estos casos son usados los antisueros polivalentes (que contienen anticuerpos de más de una especificidad).

Existen dos términos importantes en los métodos serológicos:

Idealmente, las pruebas serológicas debieran ser 100% específicas y 100% sensibles. La especificidad se refiere a la relativa ausencia de reacción cruzada de los anticuerpos con sustancias que están químicamente relacionadas (pero no idénticas) al antígeno contra el que se produjeron, y la sensibilidad se refiere a la cantidad más pequeña de sustancia desconocida (antígeno o anticuerpo) que pueda ser detectada por la prueba. Si una muestra reacciona cruzadamente con sustancias naturales diferentes a las que se intentan determinar en la prueba, decimos que se obtiene un resultado biológico falso positivo (BFP). Si una prueba serológica no detecta la sustancia que se está buscando y que realmente sí está contenida en la muestra, se obtiene un resultado biológico falso negativo (BFN). Si en cien muestras de suero que contienen todos los mismos antígenos, la prueba produce cinco BFN, se dice que tiene una sensibilidad del 95%.

Existen otros factores, tales como los errores técnicos, que producen resultados falsos positivos y negativos, pero no son considerados de origen biológico.

5. Materiales

- Agarosa al 3%
- Alcohol al 70%
- Algodón
- Antiglobulina humana
- Beaker con cloro al 5%
- Cámara húmeda
- Cloro al 5%
- Lámina porta objetos de vidrio
- Láminas con muestras positivas y negativas para inmunodifusión radial
- Muestras de suero desconocidas
- Pipetas automáticas de 20 uL
- Pipetas serológicas de 10 mL
- Pipetores o bulbos
- Puntas amarillas para pipeta automática
- Rosetones para perforar las láminas de agarosa

6. Procedimiento

Preparación de una lámina con agarosa:

- Colocar la lámina horizontalmente y con la ayuda de un hisopo estéril embadurnar con agarosa al 3% toda la superficie. Dejar secar por unos minutos.



- Con la ayuda de una pipeta serológica verter el contenido del tubo con agarosa 12 % fundida a una temperatura de unos 37-40C.
- Dejar enfriar. Horadar los pozos sobre el agar como se indica en la plantilla. Marcar la esquina superior derecha haciendo un corte sobre el agar.
- Colocar en cámara húmeda y refrigerar hasta que se vaya a utilizar.
- Abrir con la ayuda de la plantilla cinco agujeros en el centro de la lamina
- Colocar en el centro el antígeno a utilizar (antiglobulina humana) y en los agujeros de la periferia suero desconocido (Anticuerpos)
- Observar la reacción

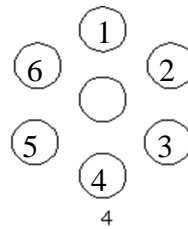
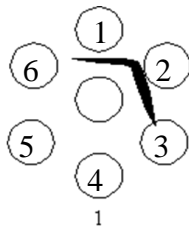
7. Interpretación de resultados

Interpretar las láminas de difusión en agar, determinando en que pozos hay reacción Ag-Ac

Interpretación:

Rosetón 1

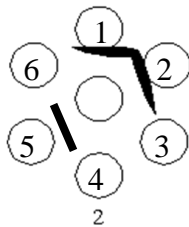
1. Positivo
2. Positivo
3. Negativo
4. Negativo
5. Negativo
6. Negativo



Rosetón 4
Todos negativos

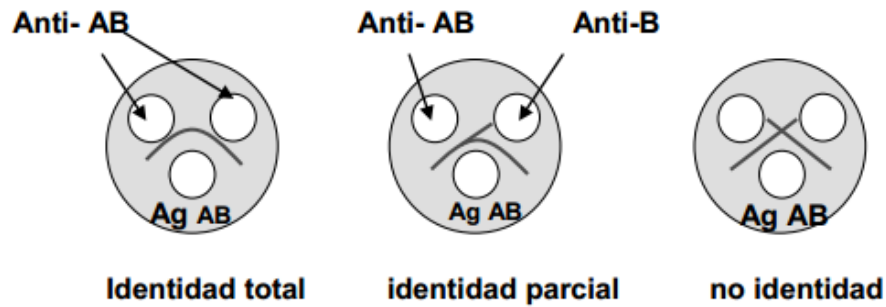
Rosetón 2

1. Positivo
2. Positivo
3. Negativo
4. Negativo
5. Positivo
6. Negativo



Existen tres tipos de reacciones

- Reacción de identidad: los dos sistemas difunden en una única banda de precipitación.
- Reacción de no identidad: cada sistema reacciona independientemente, originando bandas de precipitación que se cruzan.
- Reacción de identidad parcial: Se produce cuando uno de los antígenos tiene menos de un componente y es capaz de dar una reacción cruzada con un anticuerpo elaborado contra un antígeno más simple. En este caso las bandas de ambos sistemas se unen y funden parcialmente en una banda, apareciendo una prolongación o espolón. Esto indica que en este antígeno hay componentes antigénicos no compartidos.



8. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

Observar todas las normas de bioseguridad. Debe tomarse en cuenta que todo el tiempo se está trabajando con muestras potencialmente infectivas.

9. Formato de presentación de resultados

Entregar un informe completo sobre sus resultados obtenidos.

10. Cuestionario

- ¿Qué aplicaciones tiene la inmunodifusión radial en el diagnóstico de enfermedades?
- ¿Por qué se utiliza agarosa al 3% para la prueba de inmunodifusión radial?
- ¿Qué diferencia existe entre inmunodifusión simple y doble?
- Mencione tres ventajas de la técnica de inmunodifusión
- Mencione tres desventajas de la técnica de inmunodifusión

11. Bibliografía

- Rose NR et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. Washington, ASM, 2000.
- Stites D et al. Inmunología Clínica. México, El Manual Moderno, 1998.



REACCIÓN DE FLOCULACIÓN

Precipitación II

Práctica 5

1. Introducción

Los precipitados inmunológicos son complejos insolubles formados por la unión de anticuerpos (precipitinas) y antígenos (precipitógenos) que se encuentran en solución. Para la formación de una malla de precipitado se requiere que tanto las precipitinas como los precipitógenos sean al menos bivalentes.

Esta reacción tiende a ocurrir más rápido con el aumento de la temperatura, aunque la precipitación más completa es obtenida usualmente a temperaturas bajas (0-4°C). Está determinada por el fenómeno de zona, lo cual quiere decir que la máxima precipitación ocurre en un punto o zona de equivalencia que para poder ser visible es necesario determinar las proporciones óptimas de los reactivos.

2. Objetivos

- Comprender las bases teóricas de la reacción de precipitación
- Conocer los diferentes factores que contribuyen a la reacción
- Conocer las distintas formas de reacciones basadas en la precipitación de Ag-Ac
- Conocer las aplicaciones clínicas de la precipitación

3. Alcance

Al final de la práctica se pretende que el estudiante tenga una visión clara del fenómeno de precipitación del complejo antígeno-anticuerpo y que adquiera las destrezas para aplicar diferentes metodologías basadas en dicha reacción.

4. Antecedentes

La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo en solución, ha sido utilizada desde 1920 para la cuantificación de antígenos y anticuerpos.

Todas las reacciones de precipitación están basadas en los mismos principios físico-químicos. Los aspectos básicos de exceso y de equivalencia de antígeno o anticuerpo son de particular importancia; de hecho, la relativa solubilidad de los complejos con un exceso significativo de cualquiera de los reactantes y la insolubilidad de los mismos en la zona cercana a la equivalencia (proporciones óptimas), son críticos para el proceso de visualización.

La reacción de precipitación tiene base en la reacción fundamental antígeno-anticuerpo *in vivo*, ya que la formación de este complejo es el primer paso en la



remoción de agentes infecciosos del cuerpo por el sistema inmune. Estos complejos forman precipitados que pueden ser depurados por diversos mecanismos.

Técnica de VDRL

Las "reaginas" presentes en individuos infectados por *T. pallidum* se detectan en suero por la reacción con un antígeno cardiolipínico purificado y estabilizado conocido como reactivo de VDRL (Venereal Diseases Research Laboratory). Si la muestra contiene reagina, ésta se unirá al antígeno produciendo una floculación visible en microscopio. Una técnica modificada es la de USR (Unheated Serum Reagin) en la que no es necesario inactivar la muestra y disminuye las reacciones inespecíficas con el empleo de antígeno altamente purificado y el agregado de cloruro de colina.

Interpretación de los resultados

Reactivo: presencia de floculación.

No reactivo: ausencia completa de floculación.

Prueba semicuantitativa: el título estará dado por la inversa de la última dilución que se observe reactiva.

Limitaciones de la prueba

Resultados falsamente positivos pueden ser observados en individuos con cuadros patológicos diversos como hepatitis, influenza, brucelosis, lepra, malaria, asma, tuberculosis, cáncer, diabetes y enfermedades autoinmunes.

Estos casos no son muy comunes y generalmente presentan reacciones con títulos bajos y una historia clínica que no coincide con las características de sífilis.

Es imprescindible por estos motivos ante toda prueba cualitativa reactiva realizar la prueba semicuantitativa.

Resultados falsamente negativos pueden observarse cuando se presenta el fenómeno de prozona.

5. Materiales

- Alcohol al 70%
- Algodón
- Agua destilada
- Beaker con cloro al 5%
- Cloro al 5%
- Láminas de reacción de VDRL
- Micropipetas automáticas y puntas de 5-50 μ l
- Muestras desconocidas.



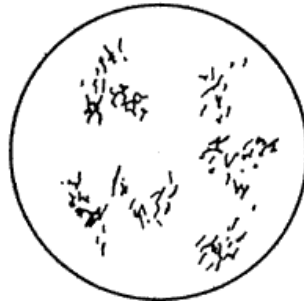
- Papel aluminio
- Reactivo de VDRL
- Toallas de papel

6. Procedimiento

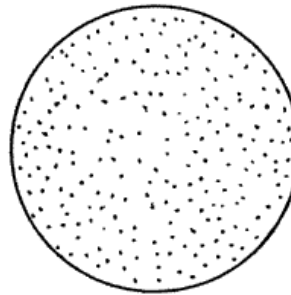
Floculación: Reacción de VDRL

- Tomar la placa e identificar los pozos como control positivo, control negativo y muestra.
- Colocar una gota de reactivo de VDRL en cada pozo
- Con la pipeta colocar una gota de la muestra (pozo de Mx) y una de control (pozo control)
- Mover la placa suavemente
- Observar en el microscopio la formación de precipitado y cuantificar por cruces, utilizando el aumento de 10x.

7. Interpretación:



Reactivo



No reactivo

8. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

Tener en mente que trabaja con materiales biológicos, potencialmente infecciosos. Aplicar las medidas de bioseguridad tanto personales, como en el descarte de los materiales.

9. Formato de presentación de resultados

Presentar los resultados en forma gráfica y en forma escrita, con una discusión de los mismos.

10. Bibliografía de referencia

- Rose NR *et al.* Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. Washington, ASM, 2000.



- Stites D *et al.* Inmunología Clínica. México, El Manual Moderno, 1998.

11. Cuestionario

1. De la sífilis investigue
 - a. Agente causal
 - b. Etapas clínicas de la enfermedad
2. ¿Qué diferencia existe entre la prueba de VDRL y RPR?
3. Explique, ¿Por qué el VDRL no es una prueba confirmatoria para sífilis?
4. Qué otras enfermedades autoinmunes pueden dar un falso positivo en la prueba de VDRL
5. ¿Qué otras pruebas inmunológicas se pueden utilizar para el diagnóstico de sífilis?, mencione por lo menos dos



REACCIONES DE AGLUTINACIÓN

Práctica 6

1. Introducción

Las reacciones de aglutinación consisten en la agregación de material en partículas, tales como células o material sintético. En este caso, el antígeno o el anticuerpo se encuentra en la superficie de una partícula (inmunológicamente inerte) y la formación del complejo inmune es evidente por formar un entramado visible. La reacción toma lugar sobre la superficie de las partículas (o células) en donde el antígeno se une a los sitios de unión específica de los anticuerpos. La aglutinación es un ejemplo de una reacción inmune secundaria.

Las primeras reacciones de aglutinación involucraban aglutininas bacterianas en experimentos llevados a cabo por los primeros bacteriólogos. Este trabajo llevó a la formulación de la idea de anticuerpos. La utilidad de este simple procedimiento dio lugar a la era del serodiagnóstico en microbiología. El uso práctico de los procedimientos de aglutinación se ha expandido de las áreas de la infectología e inmunohematología para el estudio de enfermedades infecciosas, autoinmunes, ensayos endócrinos y otros. Las técnicas clásicas de aglutinación directa han dado lugar a una variedad de técnicas que involucran el recubrimiento de partículas portadoras con antígeno (o anticuerpo), ya sea por procesos de adsorción pasiva o a través de la unión covalente de los antígenos al portador, mediante una manipulación química.

2. Objetivos

- Comprender las bases teóricas de la reacción de aglutinación
- Conocer los diferentes factores que contribuyen a la reacción
- Conocer las distintas formas de reacciones basadas en la aglutinación
- Conocer las aplicaciones clínicas de la aglutinación

3. Alcance

Al final de la práctica se pretende que el estudiante tenga una visión clara del fenómeno de aglutinación del complejo antígeno-anticuerpo y que adquiera las destrezas para aplicar diferentes metodologías basadas en dicha reacción.

4. Antecedentes

Bordet propuso que la aglutinación tomaba lugar en dos fases: a) la combinación específica del anticuerpo y el antígeno y b) la agregación visible de las partículas. Ambas fases son mediadas por la atracción específica entre el anticuerpo y el antígeno. Las partículas tales como los eritrocitos y las bacterias, poseen cargas ligeramente negativas en suspensión (potencial z) y se repelen unos a otros. La reducción de la fuerza iónica mediante proteínas u otras sustancias inorgánicas, reduce las distancias



entre las partículas, permitiendo la formación de puentes y de una malla del complejo Ag-Ac visible: la aglutinación.

Aunque la carga es importante para determinar que la aglutinación sea completa, es evidente que otros efectos juegan un papel en la aglutinación de las partículas por los anticuerpos. La viscosidad del medio de prueba, por ejemplo, aumenta la aglutinación.

La principal desventaja del fenómeno de aglutinación es que la reacción es semi-cuantitativa. Sin embargo, el hecho de que numerosos sistemas permiten reacciones de aglutinación, la simplicidad básica del sistema de aglutinación desarrollado en la actualidad y la alta sensibilidad de esta reacción, la hace de amplia aplicación y uso.

La exitosa aplicación de las reacciones de aglutinación para la detección de antígenos o anticuerpos, requiere una partícula estable, un antígeno puro y un anticuerpo específico. Generalmente, el uso del fenómeno de aglutinación también requiere el conocimiento de la posibilidad de que la reacción se realice. Los anticuerpos IgM en el medio de prueba usualmente agregan al antígeno sobre las partículas, en base al tamaño de la molécula de IgM, mientras que los anticuerpos de tipo IgG por sí mismos, no pueden completar la reacción. Se dice que la IgM es unas 750 veces más eficiente que la IgG en las reacciones de aglutinación.

También debe tenerse en mente que el llamado fenómeno de zona (pro-zona) puede contribuir a que la reacción de aglutinación no sea completa, aún con títulos adecuados de anticuerpos IgM en el medio. Este fenómeno puede producirse por diversos factores: por ejemplo, un suero de baja dilución puede no ser capaz de agregar partículas debido al recubrimiento de los sitios antigénicos con un gran número de anticuerpos individuales, situación que bajo las condiciones de equilibrio, disminuye el número de complejos. De forma similar, la cantidad de reacción también puede disminuir cuando se aumenta la concentración de antígeno. El fenómeno de prozona también puede ser producido por la alteración de proteínas (por calor, por ejemplo) o por interferencia con la aproximación excesiva de partículas por la presencia de material coloidal extraño.

En general, las reacciones de aglutinación pueden ser observadas a simple vista, sin necesidad de aumento ni la ayuda de microscopio.

En la actualidad, las partículas más empleadas como portadoras de antígeno o anticuerpo en las reacciones de aglutinación son: látex, partículas de gelatina y partículas de carbón. Los eritrocitos son empleados para las reacciones de hemaglutinación.

Los ensayos de aglutinación puede clasificarse en:

- Ensayo de aglutinación directa: es la clásica reacción que involucra la agregación de células o antígenos en partículas.
- Ensayo de aglutinación indirecta o pasiva: el desarrollo de esta técnica tiene numerosas ramificaciones en el laboratorio. Esta consiste en la aglutinación de células o partículas recubiertas artificialmente con antígeno soluble.
- Ensayo de aglutinación pasiva en reversa: es la modalidad de la aglutinación, en la que el anticuerpo está unido a las partículas.

5. Materiales



- Agua destilada
- Alcohol al 70%
- Algodón
- Aplicadores
- Beaker con cloro al 5%
- Calibradores con concentraciones conocidas de antígeno de ASO o FR
- Cloro al 5%
- Descartadores de punzo cortantes
- Láminas de reacción de fondo oscuro
- Micropipetas automáticas y puntas de 5-50 μ l
- Muestras desconocidas.

6. Procedimiento

Aglutinación pasiva de látex: Detección de Factor Reumatoideo, Antiestreptolisina O.

- Lleve los reactivos, sueros control y muestras de suero de pacientes a temperatura ambiente.
- Agregue sobre el área de reacción 50 μ l de suero o control.
- Agite el reactivo de látex, asegurándose que esté en homogéneo antes de usarlo.
- Agregue una gota de la suspensión de partículas antigénicas sobre la gota de suero.
- Con la ayuda de un aplicador, distribuya la mezcla en el área de reacción, homogéneamente.
- Agitar por 2-5 minutos sobre un agitador mecánico o con un movimiento rotatorio y gentil entre sus manos.
- Realice la lectura de resultados después del tiempo de agitación, teniendo cuidado que la mezcla no se seque.

7. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

Recuerde que las muestras de pacientes son potencialmente infectivas, por lo que debe observar las medidas universales de bioseguridad.

Aplique también las medidas de bioseguridad en el descarte de los materiales.

8. Formato de presentación de resultados

Presentar los resultados en forma escrita, con una discusión de los mismos.

Investigue las aplicaciones de la reacción de aglutinación y específicamente sobre la detección de Factor Reumatoideo y Antiestreptolisina O sus usos y su importancia.

9. Bibliografía de referencia

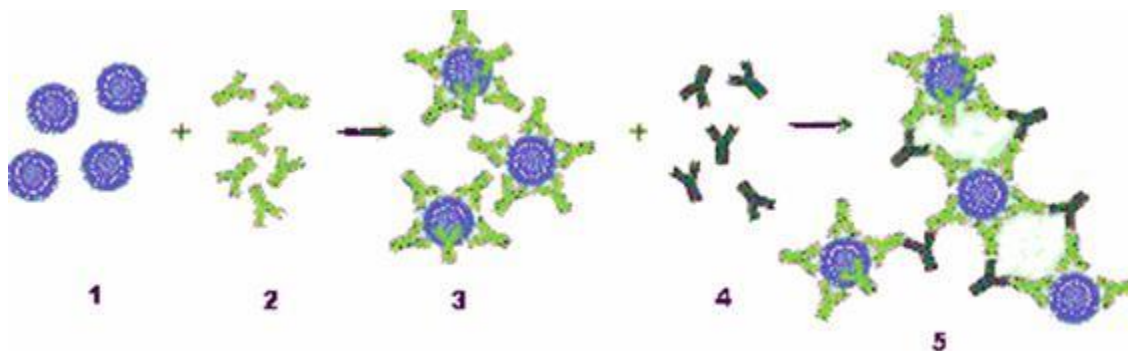
- Rose NR et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. Washington, ASM, 2000.
- Stites D et al. Inmunología Clínica. México, El Manual Moderno, 1998.

10. Cuestionario

- ¿Qué diferencias existen entre las reacciones de aglutinación y precipitación?
- Investigue sobre la importancia de detectar el Factor Reumatoideo (FR) y la Antiestreptolisina O (ASO) en un paciente.
- ¿Qué es la PCR? ¿En qué patologías se encuentra elevada?
- Esquematice la reacción que se lleva a cabo durante la aglutinación con el reactivo de PCR, ASO y FR, indicando si se detecta Ag o Ac en la muestra del paciente y el contenido de los reactivos (tome en cuenta que cada uno mide Ag o/y Ac en la muestra del paciente y que los reactivos contienen diferentes Ag o Ac)
- Describa en que consiste la prueba RPR

11. Anexo

Figura 1. Reacción de aglutinación





REACCIONES DE HEMAGLUTINACIÓN DIRECTA E INDIRECTA (Grupo ABO y Rh)

Práctica 7

1. Introducción

La hemaglutinación es una reacción de aglutinación, específicamente involucrando al eritrocito como el portador del antígeno o del anticuerpo. La determinación de grupo sanguíneo se basa en la reacción antígeno-anticuerpo, la cual se puede llevar a cabo de forma directa (determinando los antígenos presentes en la superficie del eritrocito del paciente al contacto del reactivo anti A, B, AB o D) o indirecta (determinando los anticuerpos presentes en el suero del paciente y enfrentándolo a eritrocitos conocidos (A, B o AB).

2. Objetivos

- Comprender las bases teóricas de la reacción de aglutinación para la determinación de grupo sanguíneo
- Conocer los diferentes factores que contribuyen a la reacción

3. Alcance

Al final de la práctica se pretende que el estudiante tenga una visión clara del fenómeno de aglutinación del complejo antígeno-anticuerpo para la determinación de grupo sanguíneo ABO y RH y que adquiera las destrezas para aplicar diferentes metodologías basadas en dicha reacción.

4. Antecedentes

El grupo sanguíneo son los tipos en que se ha clasificado la sangre de las personas en relación con la compatibilidad de los hematíes y suero de otro individuo que la recibe.

Según la clasificación de Landsteiner (clasificación hoy universal) y se denominan: O, A, B, AB. Se caracterizan por las diferentes combinaciones de dos aglutinógenos existentes en los glóbulos rojos y de dos aglutininas contenidas en el suero.

Los eritrocitos poseen antígenos en su membrana que son distintos para cada individuo; las pruebas utilizadas para establecer la hemoclasificación sanguínea relacionada a los diversos grupos sanguíneos, aprovechan las características inmunológicas que expresa cada individuo de acuerdo a su particular codificación genética. En dichas pruebas se evidencian los antígenos y/o anticuerpos del grupo sanguíneo, de acuerdo a su comportamiento *in vitro*.

En el sistema ABO se investigan tanto antígenos o aglutinógenos como los anticuerpos o isoaglutininas naturales.



El factor Rh es un aglutinógeno encontrado en 1940 por Landsteiner y Weiner, en los glóbulos rojos de primates (*Macacus rhesus*) y que también existe normalmente en el 85% de los humanos, que por esta causa se denomina Rh positivos. En el sistema Rh, existen varios antígenos: D, C, c, E, e; sin embargo, de rutina, solo se determina la presencia del antígeno D en los eritrocitos y de acuerdo a su presencia o ausencia se dice que un individuo es Rh D positivo o Rh D negativo.

5. Materiales

- Alcohol al 70%
- Algodón
- Beaker con cloro al 5%
- Cloro al 5%
- Descartadores de punzo cortantes
- Glóbulos rojos A, B y O
- a. Láminas de reacción de fondo oscuro
- Palillos
- Suero Anti A, Anti B, Anti A,B y anti D (anti -Rh)
- Láminas portaobjetos
- Tubos de ensayo
- Suero de grupos A, B, AB y O

6. Procedimiento

Hemoclasificación directa

Método en lámina

- Marcar tres láminas portaobjeto como A, B, AB y D.
- Adicionar una gota de anti A, anti B, anti AB y anti D en su lugar correspondiente.
- Agregar una gota de eritrócitos del paciente a cada antisuero.
- Mezclar cada preparación con un palillo de madera.
- Rotar manualmente cada lámina con cuidado de que no se mezclen.
- Observar aglutinación y registrar los resultados:

POSITIVO: La aglutinación fuerte de los glóbulos rojos en presencia de cualquier anticuerpo ABO y Rh. Las reacciones positivas muestran 3+ de aglutinación.

NEGATIVO: La presencia de una suspensión uniforme (O) de glóbulos rojos.

Método en tubo



- Separar el plasma de los eritrocitos de la muestra desconocida.
- Lavar los glóbulos rojos del paciente 3 veces consecutivos en solución salina y preparar una suspensión final al 2% en dicha solución.
- Rotular cuatro tubos con Anti A, Anti B, Anti AB y Anti D.
- Colocar una gota de suero Anti A, Anti B, Anti AB y Anti D en el tubo respectivo.
- Agregar una gota de la suspensión al 2 % de eritrocitos a cada uno de los tubos.
- Mezclar cada tubo y centrifugar 15 – 30 segundos a 3400 rpm o 1 minuto a 1000 rpm.
- Resuspender suavemente los botones celulares y observar aglutinación:
 - (4+) Botón completo, fácilmente desprendible, fondo limpio
 - (3+) Botón disperso, 2 o 3 partes, fondo limpio
 - (2+) No hay botón, pequeños grumos
 - (1+) Pequeños grumos
 - (0) No hay señales de grumos (aglutinación)

Hemoclasificación inversa

Método en tubo

- Marcar tres tubos como A, B y O.
- Adicionar dos gotas de suero del paciente a cada tubo.
- Agregar una gota de suspensión de eritrocitos del grupo A al tubo rotulado como A, una gota de eritrocitos del grupo B al tubo rotulado como B y una gota de eritrocitos del grupo O al tubo rotulado como O.
- Incubar de 5 – 15 minutos a temperatura ambiente
- Centrifugar por 15 – 30 segundos a 3400 rpm o 1 minuto a 1000 rpm.
- Resuspender los botones celulares y observar aglutinación.
- Interpretar los resultados.

7. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

Recuerde que las muestras de pacientes son potencialmente infectivas, por lo que debe observar las medidas universales de bioseguridad.

Aplique también las medidas de bioseguridad en el descarte de los materiales.

8. Formato de presentación de resultados

Presentar los resultados en forma escrita, con una discusión de los mismos.

9. Bibliografía de referencia

- Rose NR et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. Washington, ASM, 2000.

- Stites D *et al.* Inmunología Clínica. México, El Manual Moderno, 1998.

10. Cuestionario

- a. Cuáles son los carbohidratos presentes en los grupos A, B, AB y O
- b. Complete el siguiente cuadro

DONADOR DE ERITROCITOS	Antígeno en la superficie del eritrocito	Anticuerpo en el plasma
Grupo 0		
Grupo A		
Grupo B		
Grupo AB		

- c. ¿Qué inmunoglobulina son los anticuerpos presentes en el grupo ABO?
- d. ¿Qué inmunoglobulina son los anticuerpos presentes en el Rh?
- e. ¿Por qué la reacción de aglutinación es más evidente en la determinación de ABO que en Rh?, explique su respuesta

11. Anexo

Figura 1. Antígenos presentes en los grupos sanguíneos ABO

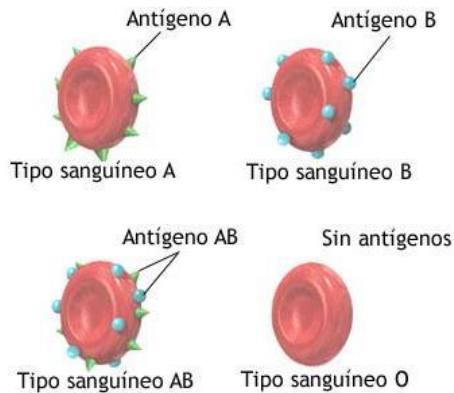


Figura 2. Esquema de reacción en la prueba de tipificación directa de grupo sanguíneo ABO

serum from individuals of type	red blood cells from individuals of type			
	AB	O	B	A
A Anti B antibodies	agglutination	no agglutination	agglutination	no agglutination
B Anti A antibodies	agglutination	no agglutination	no agglutination	agglutination
O Anti A + B antibodies	agglutination	no agglutination	agglutination	agglutination
AB no antibodies to A or B	no agglutination	no agglutination	no agglutination	no agglutination



Universidad Mariano Gálvez
Facultad de Ciencias Médicas y de la Salud
Carrera de Médico y Cirujano



HEMAGLUTINACIÓN PASIVA

Practica 8

1. Introducción

La hemaglutinación indirecta (HAI), también llamada hemaglutinación reversa pasiva, se basa en la propiedad que tienen los anticuerpos de producir aglutinación específica en presencia de glóbulos rojos sensibilizados con los correspondientes antígenos.

En el suero existen anticuerpos inespecíficos (heterófilos) que son capaces de aglutinar glóbulos rojos de distintas especies. Su presencia se investiga enfrentando el suero con glóbulos rojos no sensibilizados. Los anticuerpos interferentes se eliminan mediante tratamiento con 2-mercaptoetanol.

2. Alcance

En esta práctica el estudiante comprenderá los conceptos básicos de la hemaglutinación pasiva y su aplicación en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas.

3. Objetivos Específicos

Que el estudiante:

- Sea capaz de describir el principio de la hemaglutinación pasiva.
- Comprenda el uso eritrocitos como fuente de antígenos
- Diferencie entre un eritrocito sensibilizado y no sensibilizado
- Conozca las ventajas y desventajas de ésta técnica

4. Materiales y equipo

- | | |
|------------------------------------|--------------------------------|
| - Alcohol al 70% | - Kit de hemaglutinación |
| - Algodón | - Pipetas automaticas de 25 uL |
| - Beaker | - Pizetas cloro 5% |
| - Bolsas blancas y rojas | - Pizetas etanol 70% |
| - Cloro al 5% | - Placas de fondo en U |
| - Descartadores de punzo cortantes | - Puntas amarillas |
| - Frasco vacío de 10 mL | - Torundas de algodón |
| - Goteros de 25 uL | - Sueros control |
| - Guantes, S, M y L | |



5. Antecedentes

Aglutinación pasiva: los anticuerpos se dirigen contra moléculas que se han adherido intencionalmente a una partícula que actúa como medio de soporte pasivo (eritrocitos).

Es una técnica que puede emplearse para la determinación de anticuerpos en muestras de pacientes en enfermedades como sífilis, chagas, toxoplasmosis, etc.

Reactivos provistos en el kit:

- Antígeno HAI: glóbulos rojos de carnero sensibilizados con antígenos citoplasmáticos del agente infeccioso a determinar
- Glóbulos rojos no sensibilizados: suspensión al 1% de eritrocitos de carnero no sensibilizados, para control de heterofilia.
- 2-Mercaptoetanol: alcohol utilizado para eliminar anticuerpos interferentes
- Control Positivo: suero inactivado conteniendo anticuerpos contra el agente infeccioso a determinar
- Control Negativo: suero no reactivo, inactivado

6. Procedimiento

- Con microgotero de 25 ul, colocar una gota de Diluyente de Sueros HAI en todos los pocillos a usar de la policubeta.
- Tomar una alícuota de cada suero a ensayar con microdilutores de 25 ul (uno para cada muestra). Colocar cada microdilutor en el primer pocillo y rotarlo por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra.
- Realizar diluciones seriadas a partir del primer pocillo (dilución 1/2), pasando los microdilutores al pocillo siguiente (dilución 1/4) y así sucesivamente hasta la dilución que se desea investigar (por ejemplo: 1/8, 1/16, 1/32), rotando en cada paso el microdilutor por lo menos 10 veces para asegurar una correcta dilución de la muestra. Si se emplea una micropipeta automática de 25 ul para la toma y/o dilución de la muestra, homogeneizar por carga y descarga. Transferir 25 ul de pocillo a pocillo hasta la dilución que se desee investigar. Descartar los últimos 25 ul.
- Colocar en los pocillos conteniendo las diluciones $\frac{1}{2}$ y $\frac{1}{4}$, una gota (25 ul) de GR no sensibilizados para control de heterofilia.
- En el resto de los pocillos, agregar una gota (25 ul) de Antígeno HAI.
- Mezclar aplicando suaves golpes en los laterales de la policubeta.
- Dejar en reposo, a resguardo de vibraciones, durante 90 minutos.
- Leer a partir de los 90 minutos. Se puede aumentar la nitidez de la apreciación, leyendo sobre un espejo, iluminando la placa desde arriba e interponiendo un papel blanco y traslúcido entre la policubeta y la fuente de luz.



7. Interpretación

- No reactivo: presencia de un sedimento en forma de botón.
- Reactivo: formación de una película o manto en el fondo de los pocillos. En caso de observar la presencia de un pequeño anillo de bordes regulares, la muestra se considerará dudosa y deberá ser ensayada por otro método

8. Formato de presentación de resultados

Realice una discusión de resultados y conclusiones de la teoría e indique con un esquema el principio de la prueba (anexo)

9. Precauciones

Los Reactivos Provistos son para uso diagnóstico "in vitro". Las muestras deben manipularse como si fueran capaces de transmitir la infección. Los sueros controles han sido examinados para antígeno de superficie de hepatitis B (HBsAg) y virus de inmunodeficiencia humana (HIV) encontrándose no reactivos. Sin embargo deben emplearse como si se tratara de material infeccioso.

Todos los materiales empleados en el ensayo deben ser destruidos a fin de asegurar la inactivación de agentes patógenos.

No intercambiar reactivos de distintos equipos y lotes.

10. Bibliografía de referencia

- Rose NR et al. Manual of Clinical Laboratory Immunology. 6th ed. Washington, ASM, 2000.
- Mazza, S. - VI Congreso Nacional de Medicina (Córdoba), pág. 155 (1938).
- Cerisola, J.A. - La Prensa Médica Argentina 49/34:1761 (1962).
- Fontenla S., Moretti, E. y González, G. - 50° Triduo de la ABA, Huerta Grande (Córdoba), 1985.
- Basso, A. y col. - 50° Triduo de la ABA. Huerta Grande (Córdoba), 1985.
- Lorenzo, L.; Capriotti, G.; Rojkin, F. - Rev. Arg. Transf. XVII/ 1: 51, 1991.
- Ministerio de Salud y Acción Social, Instituto Nacional de Parasitología "Doctor Mario Fatale Chabén" - Normas para el diagnóstico de la infección chagásica - Resolución ministerial 523/97, 1998

11. Cuestionario

- a. Defina que es un eritrocito sensibilizado
- b. ¿Por qué se utiliza eritrocitos no sensibilizado como control?
- c. ¿Cuál es el procedimiento *in vitro* de sensibilización de eritrocitos con antígenos de un agente causal de enfermedad?

- d. Describa brevemente la inmunopatología de la enfermedad de la prueba utilizada
- e. Si usted tiene un paciente cuyo título de anticuerpos es 128, y le da tratamiento. Al realizarle nuevamente la prueba el título es ≥ 256 . Explique que está sucediendo con el paciente. Explique, ¿Qué haría en este caso?
- f.

12. Anexo

Figura 1. Esquema de la prueba

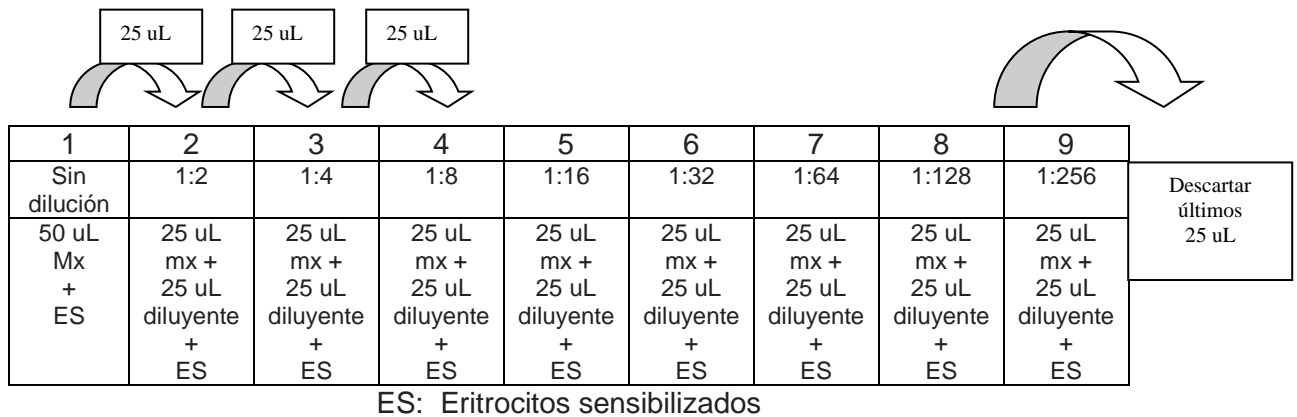
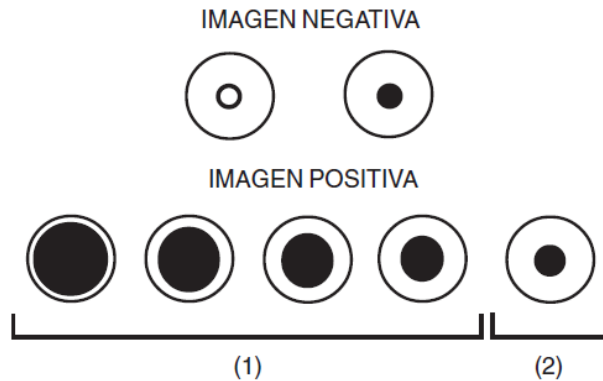


Figura 2. Interpretación de resultados





INMUNOCROMATOGRAFÍA

Práctica 9

1. Introducción

La inmunocromatografía es una de las técnicas de inmunodiagnóstico más modernas cuyas principales ventajas son la sencillez y rapidez de la prueba. Actualmente se utiliza como prueba rápida de tamizaje para la detección de antígenos o anticuerpos presentes en el suero del paciente.

2. Objetivos

- Explicar el fundamento inmunológico de la prueba de inmunocromatografía
- Conocer las aplicaciones de la prueba
- Conocer los diferentes tipos de pruebas que existen en el mercado basados en esta técnica-

3. Alcance

Al final de la práctica el estudiante podrá describir el principio de las pruebas de inmunocromatografía, así como su interpretación.

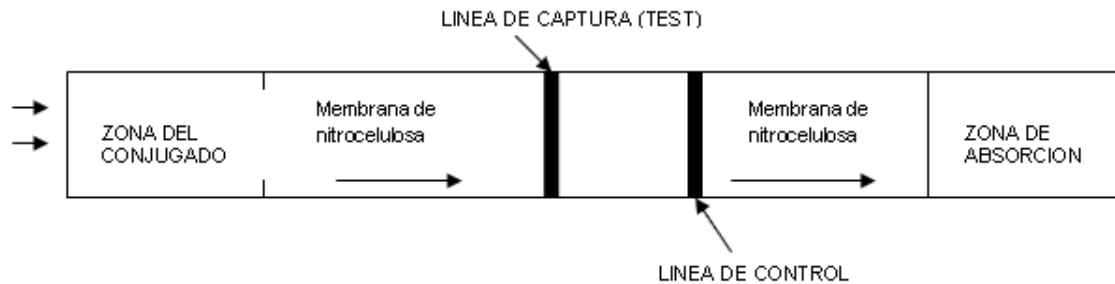
4. Antecedentes

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. De lo contrario, 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 negativa.

Figura 1. Esquema de la prueba de inmunocromatografía



5. Materiales

- Pipetas pasteur
- Pruebas rápidas de inmunocromatografía
- Papel mayordomo
- Descartador de punzocortantes
- Muestras de suero
- Beaker con cloro

6. Procedimiento

- Anotar cada una de las pruebas a realizar
- Colocar una gota de muestra de suero de paciente en cada una de las pruebas rápidas que se le proporcionan.
- Dejar que la muestra fluya a lo largo de la prueba de inmunocromatografía
- Anotar los resultados positivos y negativos

7. Interpretación de resultados

- Positivo: dos líneas en el casete
- Negativo: una línea en el casete

NOTA: Si no aparece la línea de control, la prueba debe de repetirse.

8. Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad

Recuerde que las muestras de pacientes son potencialmente infectivas, por lo que debe observar las medidas universales de bioseguridad.

Aplique también las medidas de bioseguridad en el descarte de los materiales.

9. Formato de presentación de resultados

Presentar los resultados en forma escrita, con una discusión de los mismos.



10. Cuestionario

- a. Defina que es conjugado
- b. Escriba tres ventajas y tres desventajas de estas pruebas
- c. Mencione cinco aplicaciones en el diagnóstico de enfermedades que se pueden realizar por inmunocromatografía
- d. ¿De qué está compuesto el control interno de la prueba de inmunocromatografía?
- e. ¿Cuáles son las razones por las cuales se considera una prueba de inmunocromatografía invalida?

11. Bibliografía

Inmunocromatografía. Disponible en

<http://es.scribd.com/doc/36487446/INMUNOCROMATOGRAFIA-pba-rapida>.

<http://www.socpemi.org/Doc/pruebasrapidas.pdf>

http://www.uam.es/personal_pdi/ciencias/mariamc/lacteos/practica8.htm



ENSAYO INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA)

Práctica 10

1. Introducción

La técnica ELISA (ensayos de inmunoabsorbencia ligada a enzimas) se basa en la detección de un antígeno inmovilizado sobre una fase sólida mediante anticuerpos que directa o indirectamente producen una reacción marcada enzimáticamente cuyo producto, puede ser medido espectrofotométricamente. La cantidad de antígeno se determina comparando la curva estándar generada con cantidades conocidas del antígeno.

Ventajas: versátil, robusto, simple en su realización, emplea reactivos económicos y consigue, mediante el uso de la fase sólida, de una separación fácil entre la fracción retenida y la fracción libre, es fácil de adaptar a analizadores automáticos. Este se caracteriza por ser un método cuantitativamente exacto por la medición de la velocidad de la reacción y la duración de la reacción en un instante fijo único

Desventajas: para adaptarlo a analizadores automáticos se necesitan de reactivos muy purificados, lo que aumenta el costo de las pruebas.

2. Alcance

En esta práctica el estudiante comprenderá y observará la aplicación y la elaboración del ensayo de inmunoabsorbencia ligada a enzima (ELISA).

3. Objetivos

Que el estudiante:

- Conozca los principios en los que se basa la prueba de ELISA
- Se familiarice con el equipo utilizado para la elaboración de la prueba de ELISA.
- Conozca la importancia de este tipo de pruebas y su aplicación en el ámbito de la medicina.

4. Antecedentes

Dispositivos Empleados En Elisa

Se han ensayado numerosas fases sólidas, desde los tubos de cristal de los orígenes a las actuales microplacas de 96 pocillos de plástico tratado para aumentar su capacidad de absorción de moléculas y con fondos de pocillo ópticamente claros para poder realizar las medidas de densidad óptica en instrumentos específicos, espectrofotómetros de lectura de placas que han recibido el nombre de lectores ELISA. Actualmente se están desarrollando dispositivos de mayor capacidad, por ejemplo con 384 y 1536 pocillos, adecuados para los sistemas de "screening" masivo de los sistemas robotizados (HTS, High throughput system).



Los lectores ELISA son espectrofotómetros capaces de realizar lecturas seriadas de cada uno de los pocillos de la placa ELISA. A diferencia de un espectrofotómetro convencional, con capacidad de leer todas las longitudes de onda del ultravioleta y el visible de manera continua, los lectores de ELISA disponen de sistemas de filtros que sólo permiten la lectura de una o pocas longitudes de onda. Son las que se corresponden con las necesarias para determinar la densidad óptica de los cromógenos más comúnmente utilizados.

Fases de un ensayo ELISA

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

1. Unión del antígeno (o del anticuerpo) a los pocillos.

La unión de anticuerpos o antígenos se realiza con facilidad a la superficie de plásticos tratados que tienen gran afinidad por proteínas.

Generalmente este paso ya no se realiza debido a que los kits comerciales ya lo traen.



2. Formación de una o más capas de inmunocomplejos:

Se realiza al agregar la muestra del paciente que contiene los antígenos o anticuerpos a detectar.

En el caso del antígeno unido a la placa se puede detectar mediante un anticuerpo anti-antígeno marcado (ELISA directo) o empleando un anticuerpo primario anti-antígeno y un secundario anti primario marcado (ELISA indirecto). Este segundo método permite la amplificación de la señal al poderse unir uno o más anticuerpos secundarios a cada anticuerpo primario. En el caso del anticuerpo unido a la placa se incubaba con una mezcla de antígeno y antígeno marcado. Se ensayan diferentes relaciones de antígeno frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.



3. Conjugado:

Se agrega un anti-anticuerpo ligado a una enzima (fosfatasa o peroxidasa) que se une al inmunocomplejo que ya se ha formado.



4. Revelado de la reacción enzimática.

Después de un lavado para eliminar todas las moléculas marcadas no fijadas en forma de inmunocomplejos se añade el sustrato enzimático en solución (cromógeno). Se deja reaccionar y se lee la densidad óptica (D.O.) mediante espectrofotometría.



Tipos de ensayos ELISA

Se han desarrollado múltiples variantes de ensayos ELISA que permiten desde la cuantificación de un antígeno en solución, la detección de un anticuerpo en una solución por ejemplo en el clonaje de anticuerpos monoclonales, o la determinación de la subclase (idiotipo) de un anticuerpo. A continuación se describen los más comunes. La versión más común de ELISA es el ensayo sandwich.

- **Ensayo directo:** (Ensayo ELISA simple de dos capas). Las placas ELISA se preparan recubriendo los pocillos con las soluciones en las que se sospecha se encuentra el antígeno. Se incuban con anticuerpos marcados. Indican la presencia de antígeno en la solución analizada. Es necesario incluir controles negativos que serán muestras del mismo tipo de las analizadas (sangre, orina, etc.) pero en las que se tenga la certeza de la ausencia del antígeno buscado. Asimismo se incluyen controles positivos (soluciones donde se encuentra el antígeno buscado, o bien se le ha añadido).



- **Ensayo indirecto:** Las placas ELISA se preparan de una forma idéntica a la anterior. Los controles positivos y negativos son los mismos. El sistema de detección emplea dos anticuerpos: uno primario contra el antígeno, y uno secundario marcado contra el primario. La detección tiene mayor sensibilidad por presentar una amplificación de señal debida a la unión de dos o más anticuerpo secundarios por cada primario. Es el ensayo más popular, como lo es la inmunofluorescencia indirecta, pues un mismo secundario marcado y un mismo sistema enzimático permite cuantificar una gran cantidad de antígenos.
- **Ensayo *sandwich*:** (Ensayo de captura de antígeno y detección mediante inmunocomplejos). Se trata de un ensayo muy empleado en el que se recubre el pocillo con un primer anticuerpo anti-antígeno. Después de lavar el exceso de anticuerpo se aplica la muestra problema en la que se encuentra el antígeno, que será retenido en el pocillo al ser reconocido por el primer anticuerpo. Después de un segundo lavado que elimina el material no retenido se aplica una solución con un segundo anticuerpo anti-antígeno marcado. Así pues cada molécula de antígeno estará unida a un anticuerpo en la base que lo retiene y un segundo anticuerpo, al menos, que lo marca. Este ensayo tiene una gran especificidad y sensibilidad debido a la amplificación de señal que permite el segundo anticuerpo.

Aplicaciones

Este método ha tenido una enorme aplicación en todos aquellos campos en los que se precisaba la cuantificación de productos mediante anticuerpos: diagnóstico clínico, detección viral, clasificación de anticuerpos en isotipos, búsqueda de anticuerpos monoclonales, etc.

Enzima Sustrato Tampón

Estas enzimas son utilizadas en la etapa de detección, las cuales unen de manera covalente a mAbs (anticuerpos monoclonales), sin afectar la capacidad de unión a antígenos del anticuerpo, o bien, sin inhibir la actividad de la enzima. Una gran variedad de sustratos se puede incubar con estas enzimas para generar productos de color susceptibles de cuantificación mediante espectrofotómetros con placas de microtitulación. Las enzimas más comunes empleadas en la etapa de detección son: peroxidasa de suero de caballo y la fosfatasa alcalina. A continuación se describe la preparación de las enzimas más comunes:

- HRP (peroxidasa de rábano) OPD 10 mg/25 mL de tampón citrato sódico 0.15 M pH 5; añadir microL de 30% peróxido de hidrógeno 30%
- AP (Fosfatasa alcalina) PNPP 5 mg/5 mL de tampón dietanolamina-HCl 0.1 M pH 9.8 +1 mM cloruro de magnesio
- TMB (tetrametilbenzidina) 2.5 mg/250 microL de DMSO; hasta 25 ml con tampón citrato sódico 0.1M pH 6; añadir 5 microL de peróxido de hidrógeno 30%



5. **Materiales**

- Alcohol al 70%
- Algodón
- Beaker con cloro al 5%
- Cloro al 5%
- Kit de reactivos para ELISA
- Pipetas automáticas de 100 uL
- Pipetas automáticas de 1000 uL
- Puntas azules para pipetas de 200-1000uL
- Puntas amarillas para pipetas de 200-1000uL

6. **Procedimiento**

- Permitir que los reactivos alcancen la temperatura ambiente. Organizar y etiquetar con el número necesario de tiras.
- Añadir 100 uL control positivo, control negativo y suero de paciente por duplicado en los pocillos.
 - o Pozos B1, C1 y D1: C-
 - o Pozos E1 y F1: C+
 - o Pozos G1 y H1: Mx 1
- Añadir 50 ul de conjugado en los pozos B1 al H2. Cubrir con cinta adhesiva. Mezcle suavemente. Incubar durante 90 minutos a 37°C.
- Lavar llenando cada pozo con 350 uL de solución de lavado. Repetir el procedimiento 5 veces
- Añadir 100 ul de cromógeno (sustrato) a los pozos A1 a H1. Mezcle suavemente. Cubrir con cinta adhesiva e incubar 30 minutos protegidos de la luz.
- Añadir 50 ul de solución de parada a los pozos A1 a H1. Si el cambio de color no parece uniforme, golpee suavemente la placa para que se mezcle bien.

7. **Cuidados y otros aspectos relevantes de seguridad**

Aplicar las medidas de bioseguridad en el descarte de los materiales, suero y manejo de reactivos.

8. **Formato de presentación de resultados**

Presentar los resultados en forma escrita, con una discusión de los mismos.

Investigar los diferentes análisis que se pueden realizar utilizando en ensayo de ELISA



9. Bibliografía

- Parslow t, Stites d *et al.* Inmunología básica y clínica 10 Ed. 2002. Editorial El manual moderno México. P.917 (Pág. 254 – 257).

10. Cuestionario

Indique cual es la función de los siguientes pasos en la prueba de ELISA

- a. Incubación inicial de la muestra en el pocillo
- b. Lavados
- c. Adición del conjugado
- d. Adición del cromógeno
- e. Cubrir los pozos del ELISA una vez que se ha agregado el cromógeno