



INMUNOLOGÍA GENERAL

Guías de

Laboratorio



Visión

Ser la mejor organización de educación superior posible para unir personas e ideas que buscan hacer realidad sueños y aspiraciones de prosperidad en un entorno incierto

Misión

Somos una organización de educación superior que conecta personas e ideas para impulsar la innovación y el bienestar integral a través de una cultura de pensamiento y acción emprendedora.

Universidad Continental

Material publicado con fines de estudio



ÍNDICE

VISIÓN	2
MISIÓN	2
ÍNDICE	3
NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO	4
Guía de práctica N°1 IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE	7
Guía de práctica N°2 FAGOCITOSIS IN VITRO	11
Guía de práctica N°3 PROTEINA C REACTIVA EN SUERO	14
Guía de práctica N°4 FACTOR REUMATOIDEO	19
Guía de práctica N°5 PRUEBA DE ANTIESTREPTOLISINA	24
Guía de práctica N°6 PRUEBA DE REAGINA PLASMÁTICA RÁPIDA	28
Guía de práctica N°7 PRUEBA DE EMBARAZO POR CROMATOGRAFÍA	34
Guía de práctica N°8 DIAGNÓSTICO DE SALMONELLA	41
Guía de práctica N°9 DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS	47
Guía de práctica N°10 PRUEBA RÁPIDA DE HIV	54
Guía de práctica N°11 PRUEBA SÉRICA Y GLOBULAR	59
Guía de práctica N°12 PRUEBA de H. pylori	62
Guía de práctica N°13 ENSAYO INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA)	62
Guía de práctica N° 14 MARCADORES TUMORALES	66



NORMAS BÁSICAS DE LABORATORIO

El laboratorio de Inmunología es un ámbito en el cual se trabaja con materiales de riesgo biológico, químico y físico. Por ello, toda persona vinculada a las actividades de la cátedra: docentes, estudiantes y auxiliares de los servicios de apoyo, deberán respetar y conocer las normas de bioseguridad, de acuerdo a las actividades realizadas por los mismos. Estas medidas tienden a disminuir o eliminar aquellas actividades que constituyan riesgos para la salud individual, de la comunidad y del medio ambiente.

EVALUACIÓN DE RIESGOS

Los riesgos a los que están expuestos los sujetos antes citados surgen de:

1. Manipulación de material punzocortante.
2. Manipulación y almacenamiento de muestras potencialmente infecciosas.
3. Exposición a productos químicos peligrosos.
4. Lesiones traumáticas por accidentes (quemaduras, salpicaduras, caídas por pisos resbalosos o barro, en el manejo de animales - mordeduras, rasguños, patadas- por electrocución).
5. Lesiones músculo esqueléticas posturales.
6. Peligro de incendio y catástrofes naturales (vientos fuertes, granizo, terremotos).
7. Accidentes por cansancio, trabajo rutinario, actos inseguros, desorden.

NORMAS GENERALES

- Durante el trabajo de laboratorio la puerta deberá permanecer cerrada y ninguna persona ajena a dicha actividad podrá acceder al mismo. No se permite la presencia de animales ni plantas que no sean parte del trabajo en el laboratorio.
- La puerta de acceso al laboratorio deberá exhibir el siguiente símbolo:



- Toda persona deberá lavarse las manos: antes de comenzar y al finalizar el trabajo, y luego de manipular material infeccioso o peligroso. Del mismo modo, si la persona debiera interrumpir el trabajo para: estornudar, toser, tocarse la cara, arreglarse el cabello, atender el teléfono, responder a una consulta fuera del laboratorio, utilizar los sanitarios, ingerir líquidos y alimentos, entre otros. No está permitido comer (comida, golosinas: caramelos, chicles, etc.), beber, fumar, manipular lentes de contacto, maquillarse o almacenar alimentos para uso humano en áreas de trabajo.
- Las personas que utilicen lentes de contacto deberán utilizar siempre antiparras o un protector facial. El cabello deberá estar recogido y se evitará tocarlo durante el trabajo.
- Deberá usarse en todo momento ropa protectora correctamente abrochada: guardapolvos, batas o uniformes, debiendo quitarse la misma y dejarla en el laboratorio antes de abandonar el área de trabajo. Por lo tanto, está prohibido su uso fuera del laboratorio: cantina, biblioteca, oficinas, baños y otros. No se podrá colocar el abrigo sobre el guardapolvo sucio.
- Deberá usarse calzado cerrado.
- Si no fuera posible lavar la ropa de protección en la Institución deberá doblarse de tal manera que el área de la tela expuesta permanezca en el interior. Luego, se colocará en una bolsa impermeable para su transporte, lavándose en forma separada del resto de la ropa, previa desinfección química. Deberán usarse guantes descartables en todo momento. Si se rompe o rasga un guante durante su uso, deberá ser reemplazado por otro nuevo tan rápido como lo permita la seguridad. Los guantes no deben lavarse, reutilizarse ni emplearse para tocar superficies “limpias” (teclados, teléfonos, picaportes, entre otras), y tampoco deben usarse fuera del laboratorio. Después de quitarse los guantes deberán lavarse las manos en forma inmediata.



¿Cómo lavarse las manos?

¡Lávese las manos solo cuando estén visiblemente sucias! Si no, utilice la solución alcohólica

 Duración de todo el procedimiento: 40-60 segundos



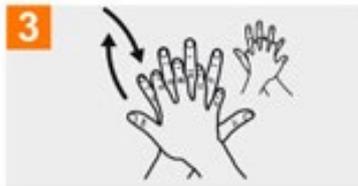
0 Mójese las manos con agua;



1 Deposite en la palma de la mano una cantidad de jabón suficiente para cubrir todas las superficies de las manos;



2 Frótese las palmas de las manos entre sí;



3 Frótese la palma de la mano derecha contra el dorso de la mano izquierda entrelazando los dedos y viceversa;



4 Frótese las palmas de las manos entre sí, con los dedos entrelazados;



5 Frótese el dorso de los dedos de una mano con la palma de la mano opuesta, agarrándose los dedos;



6 Frótese con un movimiento de rotación el pulgar izquierdo, atrapándolo con la palma de la mano derecha y viceversa;



7 Frótese la punta de los dedos de la mano derecha contra la palma de la mano izquierda, haciendo un movimiento de rotación y viceversa;



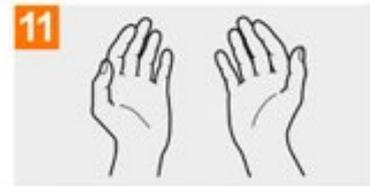
8 Enjuáguese las manos con agua;



9 Séquese con una toalla desechable;



10 Sirvase de la toalla para cerrar el grifo;



11 Sus manos son seguras.



Organización
Mundial de la Salud

Seguridad del Paciente

UNA ALIANZA MUNDIAL PARA UNA ATENCIÓN MÁS SEGURA

SAVE LIVES

Clean Your Hands



PRIMERA UNIDAD
Guía de laboratorio N° 1:

IDENTIFICACIÓN DE CÉLULAS DEL SISTEMA INMUNE

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la identificación, luego interpreta los resultados .

1. Propósito /Objetivo_:

- a. Identificar las células del sistema inmune e Interpreta sus resultados.
- b. Conocer las estructuras microscópicas de las células del sistema inmune en circulación sistémica.
- c. Desarrollar la habilidad para diferenciar las células del sistema inmune de acuerdo con su morfología microscópica y afinidad por colorantes ácidos y básicos.

2. Fundamento Teórico

El Sistema inmune consta de una serie de órganos, tejidos y células ampliamente repartidos por todo el cuerpo. Funcionalmente, los órganos se clasifican en primarios y secundarios. Los primeros suministran el microambiente para la maduración de los linfocitos, mientras que los segundos se encargan de capturar el microorganismo o antígeno, suministrando el entorno adecuado para que los linfocitos interactúen con él.

Los distintos órganos linfoides están interconectados por vasos sanguíneos y vasos linfáticos, de modo que se constituye un sistema unitario, entrelazado y bien comunicado. Estos vasos transportan células del sistema inmune, de las cuales el tipo central es el linfocito.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio	Analítica	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra con EDTA	Con anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elástica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2



7	piseta		1
8	Laminas portaobjeto		1

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Colorante Wright		5 mL
2	Agua destilada		10 ml
3	Aceite de inversión		1 ml

4. Indicaciones/instrucciones:

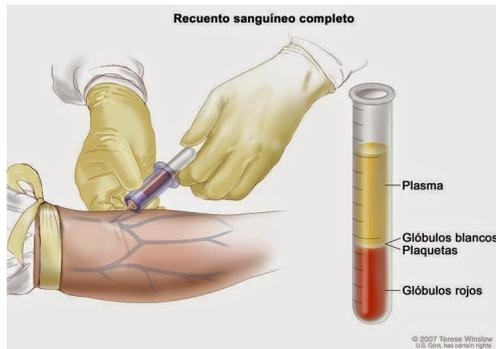
2.1 Prepara los materiales necesarios.

2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre con anticoagulante

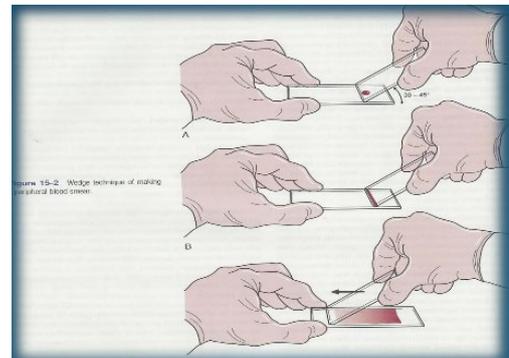
2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

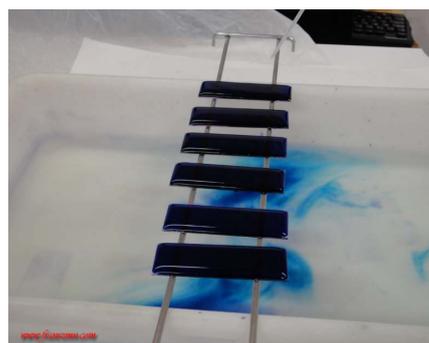
- Extracción de la muestra sanguínea.
- Realizar en frotis.
- Colorear el extendido
 - ✓ Cubrir el frotis con colorante Wright por 2 minutos
 - ✓ Colocar agua destilada, sopla para mezclar hasta la formación de un brillo metálico (en esta etapa ocurre la coloración).
 - ✓ Dejar actuar por 3 minutos.
 - ✓ Lavar con agua y dejar secar.
- Observar al microscopio a 100 x.



ó
n de sangre



Extendido de sangre





Coloración Wright

RESULTADOS

- Identificar las diferentes células del sistema inmune.
- Comparar las diferentes células del sistema inmune.

Células Sanguíneas



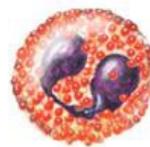
Monocito



Linfocito



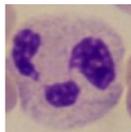
Neutrófilo



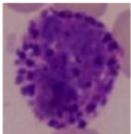
Eosinófilo



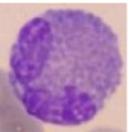
Basófilo



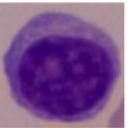
Polimorfonuclear neutrófilo: citoplasma rosado, granulaciones finas púrpura en el citoplasma (como un punteado), núcleo muy lobulado azul púrpura



Basófilo: núcleo bilobulado azul púrpura (oculto por los gránulos) y citoplasma con gran cantidad de gránulos negros



Eosinófilo: núcleo bilobulado azul púrpura, citoplasma lleno de granulaciones naranja



Linfocitos: núcleo compacto, azul púrpura y citoplasma azul celeste



Monocitos: núcleo arriñonado, laxo azul púrpura, citoplasma azul gris

6.

7. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....



7.3.....
.....

8. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 2:

FAGOCITOSIS IN VITRO

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba, luego interpreta los resultados .

1. Propósito /Objetivo_:

- a. Analizar e interpretar la fagocitosis.

2. Fundamento Teórico

Los macrófagos son células grandes con un solo núcleo, un aparato de Golgi muy desarrollado, gran cantidad de lisosomas y muy ricos en enzimas de diferentes tipos, entre los que destacan proteasas, peroxidasas y lipasas. Estas células poseen, además de la capacidad fagocítica ya indicada, capacidad de adherencia a los tejidos, al vidrio y al plástico, así como una gran movilidad en estas superficies (quimiotaxis). Los macrófagos tienen una vida media de varios meses. Poseen también gran actividad metabólica, sobre todo en lo que se refiere a síntesis de proteínas, incluso cuando se encuentran en reposo.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	Microscopio	Analítica	1
2	centrifuga		1
3	incubadora	37 °C	1
4	micropipeta	10- 50 ul	1
5	micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra con EDTA	Con anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elastica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	piseta		1



8	Lamina porta objeto		2
9	Cepa de <i>Candida albicans</i>		1
10	Tubos de vidrio	13x 75 mm	2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Colorante azul de metileno		5 mL
2	Aceite de inversión		1 ml

4. Indicaciones/instrucciones:

2.1 Prepara los materiales necesarios.

2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre con anticoagulante

2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

- Recolectar una muestra sanguínea con anticoagulante EDTA.
- Dejar la muestra en reposo hasta que el plasma se separe del paquete celular.
- Separar todo el plasma posible en un tubo.
- Agregar al plasma 0.20 ul de solución de *Candida albicans*.
- Incubar a 37° C por 30 minutos.
- Agregar al plasma azul de metileno volumen/volumen e incubar 20 minutos a 37°C.
- Realice la lectura a 40x y 100 x, buscando marófagos en trabajo de fagocitosis.





6. Cuestionario

- ¿Qué es una coloración supravital?
- ¿Cuál es la función del azul de metileno?
- ¿Cómo se encuentra la actividad de sus monocitos?

7. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

8. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 3:

PROTEINA C REACTIVA EN SUERO

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba , luego interpreta los resultados ,

1. Propósito /Objetivo_:

- a. Demostrar la presencia de PCR en el suero de un paciente con enfermedad inflamatoria.

2. Fundamento Teórico

La **proteína C** es segregada en el hígado cuando hay una inflamación aguda, infección o degradación tisular en el organismo. El incremento en los procesos inflamatorios se debe al aumento de concentración plasmática de IL-6 (producida por macrófagos, células endoteliales y linfocitos T). Ejerce una acción pro inflamatoria relacionada con la IL-1 y TNF, citoquinas que promueven su síntesis. Actúa fundamentalmente sobre hepatocitos, induciéndolos a producir reactantes de fase aguda.

La **proteína C** aumenta rápidamente al comienzo de la enfermedad, 12-24 horas luego de la inflamación o daño tisular.

Sus valores fisiológicos varían de un laboratorio a otro, pero suelen ser menores de 8 mg/L.

Estos valores pueden verse aumentados en casos de:

- Artritis aguda reumatoide
- Fiebre reumática
- Ciertas enfermedades autoinmunes
- Infarto de miocardio o pulmonar
- Infecciones bacterianas y virales
- Problemas con el rechazo en trasplantes
- Cáncer

El Tecnólogo Médico también puede realizar un examen de elevada sensibilidad, denominado *Examen de Alta Sensibilidad PCR*, para determinar el riesgo de posibles cardiopatías en el paciente. De acuerdo con la Asociación Estadounidense de Cardiología:



- Hay un riesgo bajo de desarrollar enfermedad cardiovascular si el nivel de PCR está en valores inferiores a 1 mg/L.
- Existe un riesgo promedio de sufrir enfermedades cardiovasculares si los niveles de PCR oscilan entre 1 y 3 mg/L.
- Existe un alto riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares si los niveles de PCR son superiores a 3 mg/L.

METODO DE DETECCIÓN

Está basada en la reacción serológica entre la proteína C presente en el suero, que actúa como un antígeno y los anticuerpos correspondientes absorbidos sobre un soporte inerte de partículas de látex, una prueba denominada aglutinación de látex.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	incubadora	37 °C	1
3	micropipeta	10- 50 ul	1
4	micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elástica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	piseta		1
8	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
9	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cloruro de sodio		5 mL
2	PCR Látex		
3	Control positivo		1ml
4	Control negativo		1ml



4. Indicaciones/instrucciones:

- 2.1 Prepara los materiales necesarios.
- 2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- 2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

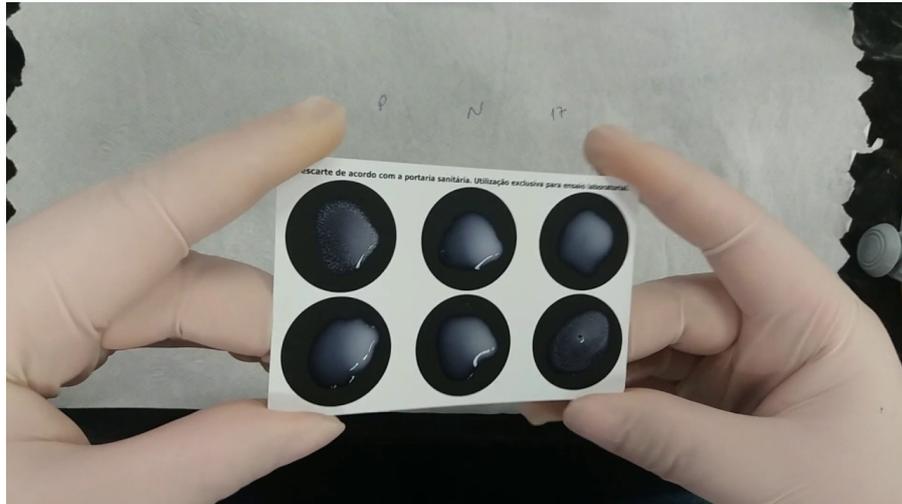
5. Procedimientos:

1. Llevar los reactivos y la muestra problema a temperatura ambiente. Agitar el reactivo de látex antes de usar.
2. Colocar una gota de suero y de los controles sobre la lámina de vidrio, usando una pipeta gotero para cada espécimen.
3. Añadir una gota del reactivo de látex sobre los especímenes previamente repartidos.
4. Mezclar con el extremo plano de la pipeta gotero hasta obtener una suspensión uniforme en toda la superficie del círculo.
5. Rotar la lámina a 80 rpm por dos minutos y luego proceder a realizar la lectura de la prueba.



6. RESULTADOS

- Un resultado positivo se evidencia por la presencia de aglutinación; la prueba es negativa cuando se observa una suspensión homogénea.
- Los valores normales de proteína C reactiva sérica en adultos son menores a 6 mg/L
- Los sueros positivos en la prueba cualitativa deben titularse a fin de estimar los niveles de PCR en la muestra.



7. Cuestionario

- ¿Qué interferencias analíticas son las más importantes?
- ¿Cuál es la sensibilidad y especificidad de la prueba?
- ¿Cuál es el fundamento de la prueba de PCR por el método de turbidimetría?
- ¿Qué indicaciones debe seguir el paciente antes de la prueba?
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

8. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....



9. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 4:

FACTOR REUMATOIDEO

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba , luego interpreta los resultados ,

1. Propósito /Objetivo_:

- Demostrar la presencia de FR en el suero mediante la prueba de látex en lámina.

2. Fundamento Teórico

Los factores reumatoideos (FR) son un grupo de anticuerpos tipo IgM (aunque también se ha descrito la presencia de IgG e IgA) que reaccionan contra el fragmento Fc de las moléculas IgG.

Los FR aparecen principalmente en el suero de pacientes con artritis reumatoide pero también otras enfermedades pueden producir FR: procesos inflamatorios crónicos, enfermedades infecciosas como endocarditis bacteriana subaguda, malaria, sífilis, lepra, leishmaniosis, tuberculosis y variedad de enfermedades autoinmunes como el lupus eritematoso sistémico. Además, los FR pueden estar presentes en niveles bajos en personas sanas (3-5%) y en personas de edad avanzada, donde alcanzan una mayor prevalencia.

El diagnóstico clínico no debe realizarse teniendo en cuenta el resultado de un único ensayo, sino que debe integrar los datos clínicos y de laboratorio.

METODO DE DETECCIÓN

Está basada en la reacción serológica, el antígeno es una suspensión de partículas de látex sensibilizadas con gamma globulina humana que aglutina en presencia de FR.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	incubadora	37 °C	1
3	micropipeta	10- 50 ul	1
4	micropipeta	50- 100 ul	1



3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elastica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	piseta		1
8	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
9	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2
10	Láminas de fondo oscuro		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cloruro de sodio		5 MI
2	FR Latex		5 ml
3	Control positivo		1ml
4	Control negativo		1ml





4. Indicaciones/instrucciones:

- 2.1 Prepara los materiales necesarios.
- 2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- 2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

1. Llevar los reactivos y la muestra problema a temperatura ambiente. Agitar el reactivo de látex antes de usar.
2. Colocar una gota de suero y de los controles sobre la lámina de vidrio, usando una pipeta gotero para cada espécimen.
3. Añadir una gota del reactivo de látex sobre los especímenes previamente repartidos.
4. Mezclar con el extremo plano de la pipeta gotero hasta obtener una suspensión uniforme en toda la superficie del círculo.
5. Rotar la lámina a 80 rpm por dos minutos y luego proceder a realizar la lectura de la prueba.

6. RESULTADOS

7. Un resultado positivo se evidencia por la presencia de aglutinación; la prueba es negativa cuando se observa una suspensión homogénea.
8. La presencia de aglutinación indica un contenido de FR en suero igual o superior a 8 UI/ml
9. Los sueros positivos en la prueba cualitativa deben titularse a fin de estimar los niveles de FR en la muestra.

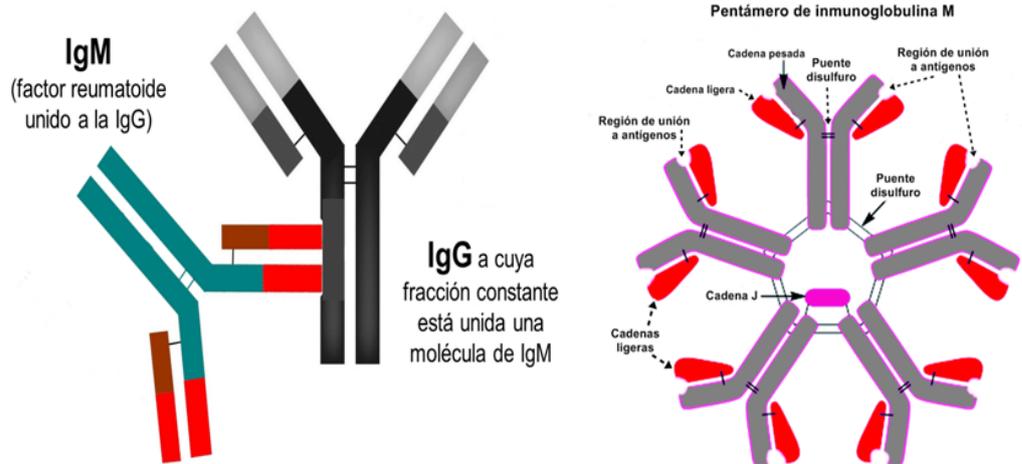


Figura 3. A la izquierda, una inmunoglobulina de tipo IgM unida a la cadena pesada de una molécula de inmunoglobulina IgG (autoanticuerpo IgM denominado “factor reumatoide”). A la derecha una agrupación de cinco moléculas de IgM (pentámero), unidas por cadenas J. Las IgG también pueden formar polímeros o agrupaciones. Los factores reumatoides pueden dirigirse contra moléculas de IgG individuales o agrupadas en polímeros, siendo esto último lo más frecuente.



10. Cuestionario

- ¿Qué métodos más sensibles existen para el diagnóstico de artritis reumatoide?
- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

11. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

12. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



SEGUNDA UNIDAD
Guía de laboratorio N° 5:

PRUEBA DE ANTIESTREPTOLISINA O

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba , luego interpreta los resultados ,

1. Propósito /Objetivo_:

- Demostrar la presencia de ASO en el suero mediante la prueba de látex en lámina.

2. Fundamento Teórico

Los Streptococcus beta hemolíticos del grupo A son causantes de faringitis, amigdalitis, escarlatina, sepsis puerperal, erisipela y secundariamente fiebre reumática y glomerulonefritis aguda. Estos microorganismos producen varios antígenos (estreptocinasa, estreptolisina O y S, hialuronidasa, etc), que estimulan la producción de anticuerpos, un título alto indica una infección reciente.

METODO DE DETECCIÓN

El reactivo de látex está constituido por una suspensión de partículas de poliestireno sensibilizadas con estreptolisina o.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	incubadora	37 °C	1
3	micropipeta	10- 50 ul	1
4	micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elastica	1



5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	piseta		1
8	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
9	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2
10	Láminas de fondo oscuro		2

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cloruro de sodio		5 mL
2	ASO Latex		5 ml
3	Control positivo		1ml
4	Control negativo		1ml



4. Indicaciones/instrucciones:

- Prepara los materiales necesarios.
- Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

6. Procedimientos:



1. Llevar los reactivos y la muestra problema a temperatura ambiente. Agitar el reactivo de látex antes de usar.
2. Colocar una gota de suero y de los controles sobre la lámina de vidrio, usando una pipeta gotero para cada espécimen.
3. Añadir una gota del reactivo de látex sobre los especímenes previamente repartidos.
4. Mezclar con el extremo plano de la pipeta gotero hasta obtener una suspensión uniforme en toda la superficie del círculo.
5. Rotar la lámina a 80 rpm por dos minutos y luego proceder a realizar la lectura de la prueba.

7. RESULTADOS

- Un resultado positivo se evidencia por la presencia de aglutinación; la prueba es negativa cuando se observa una suspensión homogénea.
- La presencia de aglutinación indica un contenido de FR en suero igual o superior a 200 UI/ml
- Los sueros positivos en la prueba cualitativa deben titularse a fin de estimar los niveles de ASO en la muestra.





8. Cuestionario

- Investiga sobre otros métodos y compáralos, no olvides los fundamentos.
- ¿Qué métodos más sensibles existen para el diagnóstico de ASO?
- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

9. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

10. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 6:

PRUEBA DE REAGINA PLASMÁTICA RÁPIDA

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba, luego interpreta los resultados.

1. Propósito /Objetivo_:

- Demostrar la presencia de anticuerpos (reagina) en el suero mediante la prueba de RPR.

2. Fundamento Teórico

La sífilis es una enfermedad venérea causada por el *Treponema pallidum*, que invade las mucosas intactas o la piel en áreas de abrasiones. El contacto sexual es la forma más común de transmisión. La detección y tratamiento de la enfermedad en sus estadios tempranos es fundamental a fin de evitar complicaciones graves como sífilis cardiovascular, neurosífilis y sífilis congénita. El diagnóstico de esta enfermedad sufre la carencia de un método para cultivar el microorganismo en medios de laboratorio

y la dificultad para detectarlo en estadios de la enfermedad en los que no se observan lesiones epidérmicas. Sin embargo, desde el comienzo de la infección aparecen en el suero del individuo infectado ciertas sustancias denominadas "reaginas", que reaccionan con antígenos de cardiolipina, lecitina y colesterol.

METODO DE DETECCIÓN

En la prueba rápida para reaginas plasmáticas (RPR), las "reaginas" presentes en el suero de individuos infectados con *Treponema pallidum*, se detectan por acción de las mismas con antígeno de cardiolipina, lecitina y colesterol adsorbido sobre partículas de carbón. La reacción produce una aglutinación visible macroscópicamente, favorecida por las partículas de carbón. Las reacciones inespecíficas se evitan con el empleo de antígeno altamente purificado y el agregado de cloruro de colina, por lo que no es necesario inactivar la muestra.



3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	incubadora	37 °C	1
3	micropipeta	10- 50 ul	1
4	micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elastica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	piseta		1
8	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
9	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2
10	Láminas de fondo blanco		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cloruro de sodio		5 mL
2	ASO Latex		5 ml
3	Control positivo		1ml
4	Control negativo		1ml





4. Indicaciones/instrucciones:

- Prepara los materiales necesarios.
- Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

6. Procedimientos:

1. Llevar los reactivos y la muestra problema a temperatura ambiente. Homogenizar el reactivo de RPR antes de usar.
2. Colocar una gota de suero y de los controles sobre la lámina, usando una pipeta para cada espécimen.
3. Añadir una gota del reactivo con su respectivo dispensador sobre los especímenes previamente repartidos.
4. Mezclar cuidadosamente con el extremo plano de la pipeta gotero hasta obtener una suspensión uniforme en toda la superficie del círculo.
5. Rotar la lámina a 100 rpm por dos minutos y luego proceder a realizar la lectura de la prueba.

6. RESULTADOS

Reactivo: presencia de aglutinación visible en forma de grumos negros sobre el fondo claro que indica presencia de "reaginas" en la muestra.

No reactivo: aspecto gris homogéneo que indica ausencia de "reaginas" en la muestra.

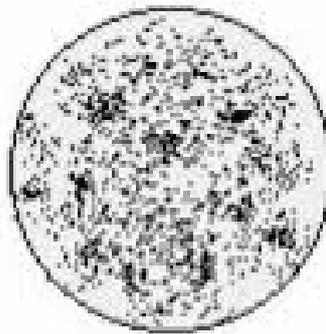
PRUEBA SEMICUANTITATIVA

Efectuar diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, hasta 1:64 empleando solución fisiológica y proceder de la misma manera que en la técnica cualitativa. El título estará dado por la inversa de la última dilución que se observe reactiva.

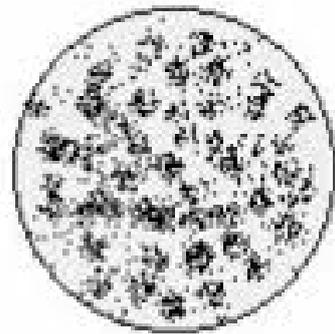
REACTIVOS Y MATERIALES:



Non reactive



Weakly reactive



Strongly reactive



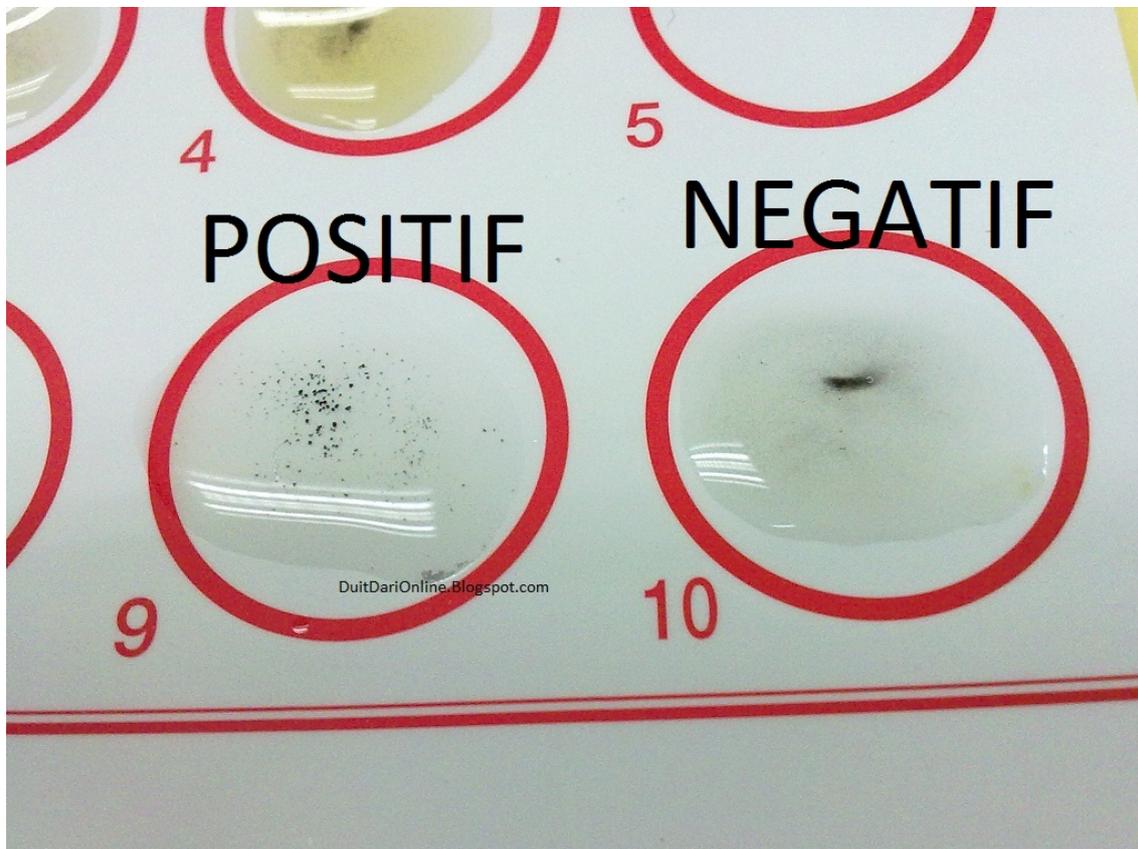
Interpretación RPR cuantitativa

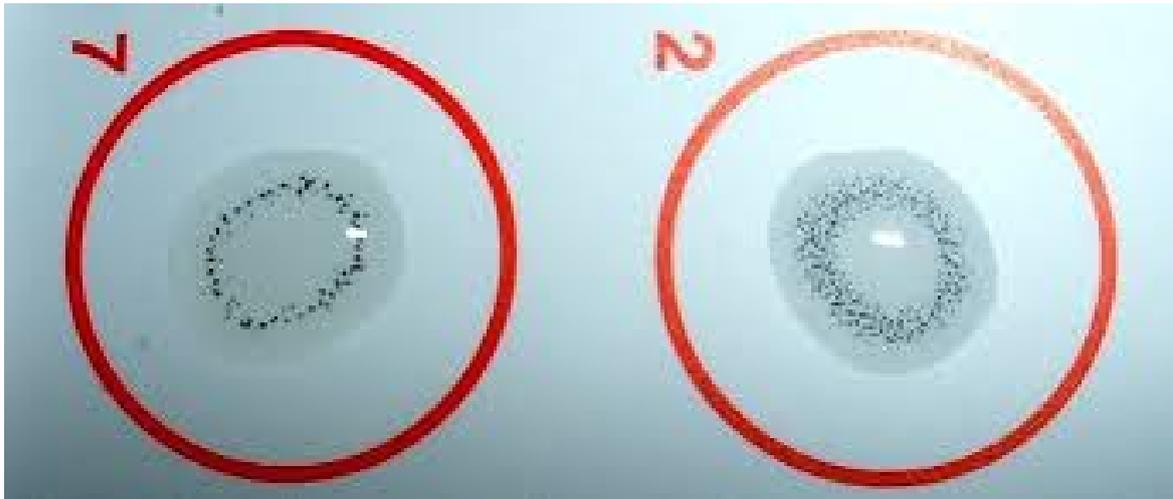
Dilución de suero					Reporte
Suero no diluido 1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	
Rm	N	N	N	N	Reactivo dilución 1:1 o 1 dils.
R	R	N	N	N	Reactivo dilución 1:2 o 2 dils.
R	R	R	N	N	Reactivo dilución 1:4 o 4 dils.
R	R	R	Rm	N	Reactivo dilución 1:8 o 8 dils.

R= reactivo Rm= mínima reactividad N= no reactivo

Septiembre de 2009

PRUEBA POSITIVA Y NEGATIVA





7. Cuestionario

- ¿Por qué RPR es una prueba no treponémica?
- ¿Qué Pruebas Treponémicas se usan con mayor frecuencia?
- ¿Cuáles son las interferencias más importantes entre ambas pruebas?
- ¿Qué paso se sigue cuando tenemos un RPR reactivo?
- ¿Qué diferencia existe entre la prueba de VDRL y RPR?
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

8. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

9. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 7:

PRUEBA DE EMBARAZO POR CROMATOGRAFÍA

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba , luego interpreta los resultados ,

1. Propósito /Objetivo_:

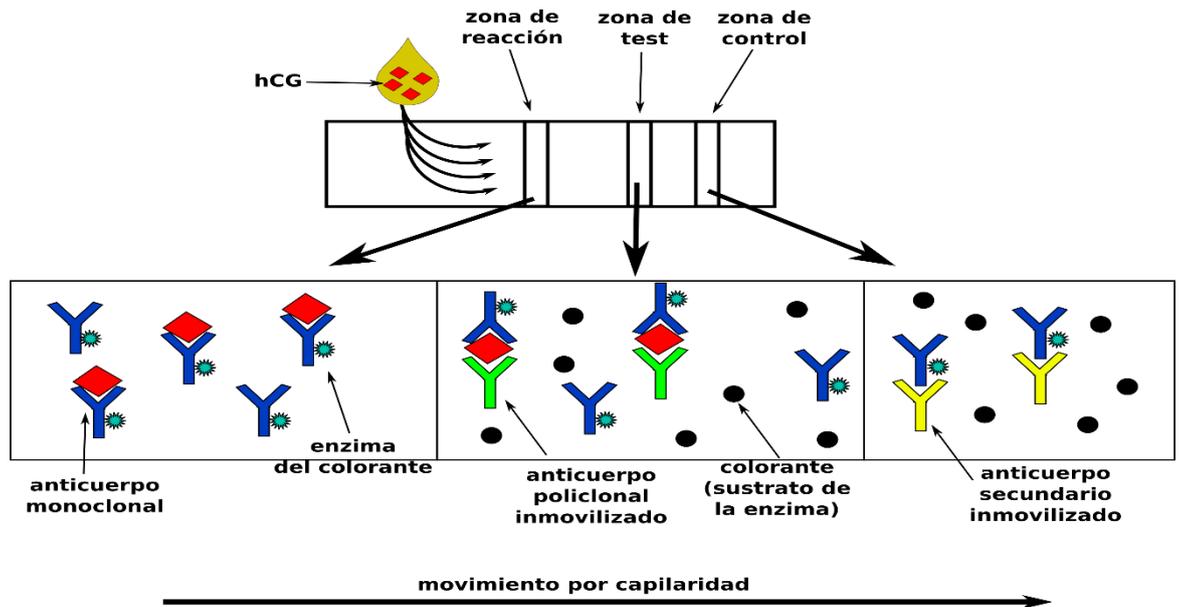
- Demostrar los niveles de HCG-B en el suero u orina e interpretar los resultados.

2. Fundamento Teórico

La gonadotropina coriónica humana (HCG) es una hormona producida por la placenta de mujeres embarazadas. Es detectable, tanto en orina como en suero, de 7 a 10 días tras la concepción, por lo que la hace un indicador ideal del embarazo.

PRINCIPIO DE LA PRUEBA:

La prueba de HCG-B es un inmunoensayo por cromatografía de flujo lateral. El método emplea una combinación única de conjugado anticuerpo monoclonal-enzima y anticuerpos policlonales en fase sólida para identificar selectivamente HCG presente en las muestras, con un elevado grado de sensibilidad. En menos de 5 minutos, pueden detectarse niveles de HCG tan bajos como 10 mIU/ml. Cuando se aplica una cantidad suficiente de muestra en la porción absorbente, ésta migra por capilaridad a través de la tira. El conjugado anticuerpo-colorante se une a la HCG formando un complejo anticuerpo-antígeno. Este complejo se une al anticuerpo anti-HCG de la zona de reacción positiva produciendo una banda coloreada rosa cuando la concentración de HCG es mayor de 10 mIU/ml. En ausencia de HCG, no se observa banda alguna en la zona de reacción positiva. La mezcla de reacción continua la migración a través de la tira hasta la zona control. El conjugado libre aún, se une a los reactivos de la zona control formando una banda coloreada rosa, demostrando el correcto funcionamiento del test.



3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	incubadora	37 °C	1
3	micropipeta	10- 50 ul	1
4	micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elastica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	Piseta		1
8	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
9	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2
10	Láminas de fondo oscuro		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Tiras cromatográficas		2
2	Control positivo		1ml
3	Control negativo		1ml





4. Indicaciones/instrucciones:

- Prepara los materiales necesarios.
- Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

TOMA DE MUESTRA

a) Suero

- La muestra de suero debe ser recogida en condiciones de laboratorio estándares (asépticamente de tal modo que se evite la hemólisis).
- No se requiere centrifugación ni filtración del suero.
- Si el test se realiza dentro de las 48 horas tras la recogida, la muestra debe mantenerse refrigerada (2-8°C).
- Si el test se retrasa más de 48 horas, la muestra debe congelarse. Antes de testarla, la muestra debe descongelarse completamente, mezclarla perfectamente y atemperarla. Evitar congelar y descongelar repetidamente.
- En caso de turbidez, elevada viscosidad o presencia de partículas en la muestra de suero, debe diluirse con el mismo volumen de tampón diluyente (V/V) antes de realizar el ensayo.

b) Orina

- Para la detección óptima de embarazos tempranos, es preferible recoger la primera orina de la mañana, puesto que ésta contiene la máxima concentración de hCG.
- Debe recogerse la orina en un contenedor limpio.
- Si el test no se realiza inmediatamente, la muestra debe mantenerse refrigerada (2°C – 8°C) o en ambiente fresco (inferior a 25°C) hasta 24 horas. En tal caso, atemperar la muestra antes de realizar el test.
- Si el test se retrasa más de 24 horas, debe congelarse la muestra. Antes de testarla, la muestra debe descongelarse completamente, mezclarla perfectamente y atemperarla. Evitar congelar y descongelar repetidamente.



7. Procedimientos:

1. Atemperar la muestra y los otros materiales necesarios para el test, antes realizar el ensayo.
2. Identificar cada tira con los datos de la muestra.
3. Dispensar 0,5 ml de muestra en un pequeño tubo o vial.
4. Introduzca verticalmente la tira hCG en la muestra durante 5 segundos para las muestras de orina o 10 segundos para las muestras de suero. No sobrepasar la marca roja. Si el nivel de muestra en el tubo es menor de 1,5 cm, se puede dejar la tira dentro del tubo hasta finalizar el tiempo de reacción. En caso contrario, coloque la tira en otro tubo o sobre una superficie limpia, plana y seca.
5. Leer en ambos casos el resultado a los 3-5 minutos. **NO INTERPRETAR RESULTADOS TRANSCURRIDOS 10 MINUTOS.**



CONTROL DE CALIDAD

* Control de Calidad interno: El test contiene un control de calidad interno, la banda control. Su presencia indica que se ha usado un volumen adecuado de muestra y que los reactivos han migrado correctamente. Si no aparece esta línea, el test debe considerarse no válido. En este caso, es aconsejable revisar las instrucciones y repetir el test con una nueva tira.

* Control de Calidad externo: El usuario deberá seguir la normativa de control de calidad propia de cada localidad, región o país.

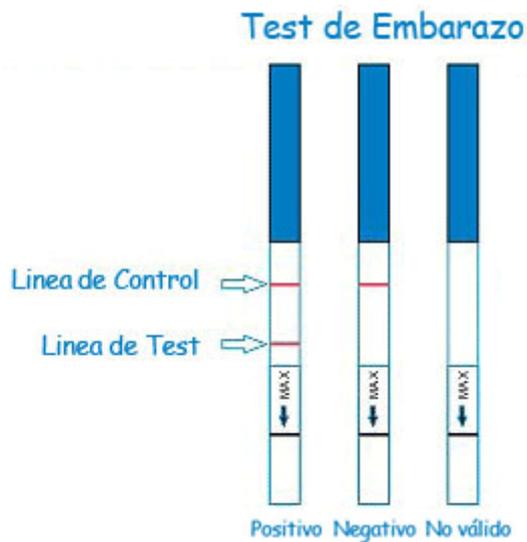
INTERPRETACIÓN DE RESULTADOS

Negativo: Si sólo aparece una banda coloreada transversal en la zona blanca superior (banda control).



Positivo: Además de la banda transversal roja (control) aparece una segunda banda transversal roja (test) en la zona blanca central de la t a. ir. Cualquier resultado positivo debe ser confirmado con un método más específico antes de dar una determinación positiva.

No válido: Si no aparece ninguna banda coloreada visible se recomienda repetir el test con una nueva placa u obtener una muestra fresca y testarla 48 horas después.



LIMITACIONES DEL PROCEDIMIENTO

1. El test es sólo para diagnóstico in vitro profesional.
2. Los resultados obtenidos con este test proporcionan un resultado preliminar cualitativo, no pueden considerarse concluyentes. Un resultado positivo debe confirmarse con técnicas alternativas más específicas.
3. Este producto está diseñado sólo para el análisis de orina / suero humano.
4. También se ha detectado presencia de hCG en pacientes con enfermedad trofoblástica gestacional y no-gestacional. Como la hCG de neoplasmas trofoblásticos es similar a la encontrada durante el embarazo, estas condiciones, que incluyen coriocarcinoma y mola hidatidiforme deben de excluirse antes de realizar un diagnóstico de embarazo.
5. Un embarazo normal no puede distinguirse de un embarazo ectópico basándose únicamente en los niveles de hCG. También, los abortos espontáneos pueden crear confusión durante la interpretación de los resultados.
6. Embarazos muy tempranos, conteniendo concentraciones extremadamente bajas de hCG pueden dar resultados negativos. En tal caso, deberá obtenerse otra muestra por lo menos 48 horas más tarde y testarla.



- Los niveles de hCG pueden permanecer detectables varias semanas en secreciones normales, secreción por cesárea, abortos espontáneos o terapéuticos.
- Los resultados del test deben usarse en conjunto con informaciones disponibles de la evaluación clínica del paciente y otros procedimientos de diagnóstico.
- La presencia de hidroxietil-celulosa en la composición de lubricante de catéteres puede dar lugar a falsos resultados positivos en el STICK hCG en concentraciones iguales o superiores al 0.1%.

Niveles de Referencia:

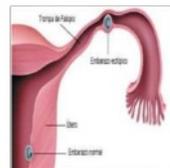
Lo siguiente es una lista de los niveles séricos de hCG. (UPM significa último período menstrual). Los niveles crecen de forma exponencial después de la concepción e implantación.

Semanas desde el UPM	mIU/mL
3	5 – 50
4	5 – 426
5	18 – 7.340
6	1.080 – 56.500
7 – 8	7.650 – 229.000
9 – 12	25.700 – 288.000
13 – 16	13.300 – 254.000
17 – 24	4.060 – 165.400
25 – 40	3.640 – 117.000
Mujeres no embarazadas	<5.0
Mujeres post-menopáusicas	<9.5



Los niveles de GCH aumentan cada 48 h al comienzo del embarazo, y si no pasa puede que haya problemas

Niveles de GCH anormalmente elevados puede ser que indicio de problemas como aborto espontáneo o ectópico (tubarico)



Los niveles extremadamente altos de GCH pueden sugerir la presencia de un embarazo molar o de más de un feto, por ejemplo, gemelos.



8. Cuestionario

- Investiga sobre otros métodos y compáralos, no olvides los fundamentos.
- ¿Qué métodos más sensibles existen para el diagnóstico de HCG?
- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

9. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

10. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



TERCERA UNIDAD
Guía de laboratorio N° 8:
DIAGNÓSTICO DE SALMONELLA

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba, luego interpreta los resultados .

1. Propósito /Objetivo_:

- Realizar el diagnostico para salmonella en placa.

2. Fundamento Teórico

El suero del paciente se pone en contacto con antígenos específicos. En este caso se utilizan suspensiones antigénicas de Salmonellas o Brucella. Si la muestra contiene los anticuerpos correspondientes se producirá una aglutinación visible macroscópicamente.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

A Las Salmonellas se consideran patógenos entéricos obligados. Los alimentos y el agua contaminados son los mecanismos de transmisión. La enfermedad puede presentarse como gastroenteritis, septicemia con lesiones en diversos órganos o fiebre tifoidea. La Brucelosis se presenta en la mayoría de los casos con anorexia, fiebre, decaimiento y escalofríos, pudiendo aparecer luego complicaciones importantes como son las óseas y neuropsíquicas. A pesar de que el método definitivo para establecer la etiología de estas enfermedades es a través del aislamiento del agente patógeno, esto resulta difícil debido a que la investigación se realiza frecuentemente en períodos tardíos de la enfermedad y luego de una terapia antibiótica. Por este motivo es de gran importancia diagnóstica la detección de los anticuerpos específicos producidos en el curso de cada una de estas patologías. Una prueba aislada es de escaso valor, siendo necesarias 2 o más pruebas seriadas a fin de poner en evidencia cambios en el título de anticuerpos.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	micropipeta	10- 50 ul	1
3	micropipeta	50- 100 ul	1



3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elastica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	piseta		1
8	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
9	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2
10	Láminas de vidrio		1

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cloruro de sodio		5 mL
2	Antígenos Paratyphi A		5 ml
3	Antígenos Paratyphi B		5 ml
4	Antígenos Typhi H		5 ml
5	Antígenos Typhi O		5 ml
6	Control positivo		1ml
7	Control negativo		1ml





5. Indicaciones/instrucciones:

- Prepara los materiales necesarios.
- Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

6. Procedimientos:

REACTIVOS

Antígenos Febriles Salmonella: suspensión en solución salina con conservantes apropiados, conteniendo los siguientes antígenos bacterianos:

- Antígenos Paratyphi A (Salmonella, antígeno flagelar a).
- Antígenos Paratyphi B (Salmonella, antígeno flagelar b).
- Antígenos Typhi H (Salmonella, antígeno flagelar d).
- Antígenos Typhi O (Salmonella, antígeno somático D).

Antígenos Febriles Brucella: suspensión de antígenos bacterianos (Brucella abortus, cepa 1119-3) en solución fisiológica con conservantes apropiados. La concentración celular de los antígenos se encuentra entre el 4 y el 6%. Las bacterias utilizadas se encuentran en fase lisa.

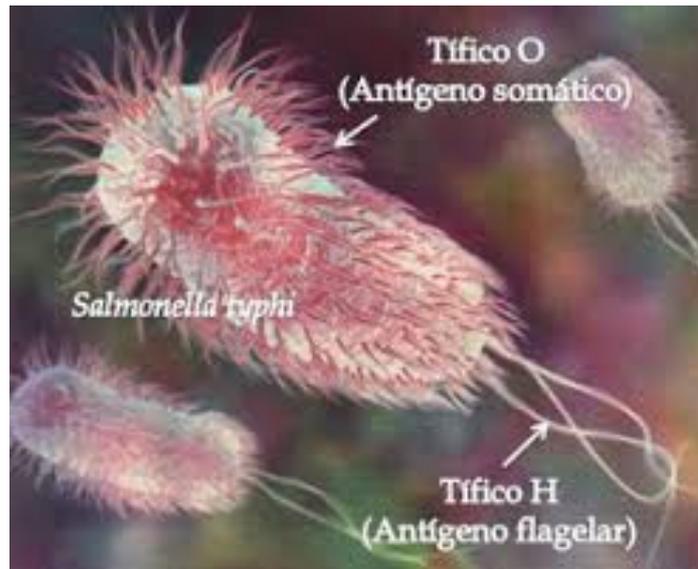
Antígenos Febriles Controles:

- Control Positivo: dilución de suero humano inactivado positivo.
- Control Negativo: dilución de suero humano negativo.

MUESTRA

Suero

- a) Recolección: debe obtenerse suero límpido en forma estéril. No inactivar ni calentar ya que los anticuerpos son termolábiles.
- b) Aditivos: no se requieren.
- c) Sustancias interferentes conocidas: la hemólisis visible y los quilomicrones pueden dar reacciones inespecíficas.
- d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: las muestras pueden conservarse 7 días en refrigerador (2-10 o C)



TITULACIÓN RÁPIDA EN PLACA (reacción de Widal).

- 1) Dividir una placa de vidrio en sectores de 4 cm² aproximadamente.
- 2) Empleando las micropipetas apropiadas colocar suero fresco en estos sectores 80 ul primer sector, 40 ul segundo sector, 20 ul tercer sector, 10 ul cuarto sector y 5 ul quinto sector. Repetir el procedimiento para un control negativo y uno positivo.
- 3) Colocar 1 gota de Antígeno previamente agitado sobre cada gota de suero.
- 4) Mezclar el suero y el Antígeno utilizando una varilla abarcando un área de 2 cm de diámetro aproximadamente. Debe emplearse una varilla distinta para cada dilución de suero o la misma varilla mezclando a partir de la muestra más diluida.
- 5) Agitar la placa durante 2 minutos en forma circular.
- 6) Observar la aglutinación utilizando luz indirecta sobre fondo oscuro.

7. RESULTADOS

11. INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

12. 4+: todos los microorganismos aglutinan.
13. 3+: aglutinan aproximadamente el 75%.
14. 2+: aglutinan aproximadamente el 50%.
15. 1+: aglutinan aproximadamente el 25%.
16. Negativo: no aparece aglutinación.

17. VALORES DE REFERENCIA

18. Generalmente títulos de 1:40 ó 1:80 son sospechosos de enfermedad. Sólo títulos mayores de 1:80 pueden considerarse probatorios de diagnóstico de enfermedad cuando estén acompañados de la sintomatología clínica. Títulos mayores de 1:320, son concluyentes.



19.

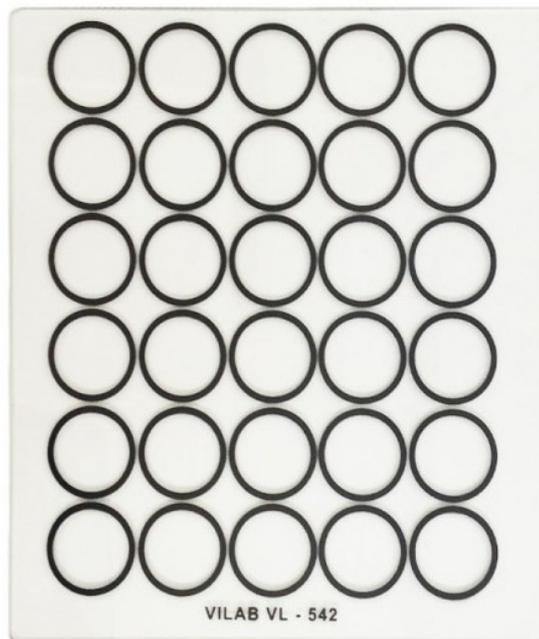
Antígeno Febril Paratífico A
Cepa: *Salmonella paratyphi* A 2,12:a:-
pH: 6.5 ± 1.0

Antígeno Febril Paratífico B
Cepa: *Salmonella paratyphi* B 1,4,5,12:b:1,2.
pH: 6.5 ± 1.0

Antígeno Febril Tífico O
Cepa: *Salmonella typhi* 9,12
pH: 6.5 ± 1.0

Antígeno Febril Tífico H
Cepa: *Salmonella typhi* 9,12 (v):d:-
pH: 6.5 ± 1.0

20.



21.

22. TITULACIÓN PARA SALMONELLAS



Suero	Dilución
0.08 ml	1:20
0.04 ml	1:40
0.02 ml	1:80
0.01 ml	1:160
0.005 ml	1:320
0.0025 ml	1:620

23.

24. Cuestionario

- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

25. Conclusiones

7.1.....
.....
7.2.....
.....
7.3.....
.....

26. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 9:

DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE BRUCELOSIS

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba , luego interpreta los resultados ,

1. Propósito /Objetivo_:

- Realizar el diagnostico serológico para brucelosis.

2. Fundamento Teórico

La brucelosis conocida también como fiebre ondulante o fiebre malta, es una enfermedad zoonótica caracterizada por una fase aguda seguida por una fase crónica que puede prolongarse muchos años y llegar a afectar a diversos tejidos.

Con el propósito de confirmar si el paciente padece de brucelosis se realizan hemocultivos y mielocultivos en los laboratorios de bacteriología y en los laboratorios de inmunología se practican pruebas serológicas que detectan la presencia de IgG.

Al principio de la enfermedad aparecen los anticuerpos aglutinantes IgM, un poco más tarde los anticuerpos IgG y los anticuerpos bloqueadores. Mientras que los anticuerpos IgM pueden persistir después de la recuperación, el hallazgo de un título significativo de anticuerpos IgG indica infección y enfermedad activa. Por eso, los mejores resultados se logran cuando se aplican varios procedimientos diagnósticos y los interpretamos en conjunto, sobre todo para determinar brucelosis aguda, subaguda o crónica.

Las pruebas utilizadas son: aglutinación en lámina, como prueba rápida, Rosa de bengala, como prueba de tamiz, y luego se realizan las pruebas de aglutinación en tubo y 2-mercaptoenatol. En la fase crónica es necesario hacer la prueba de anticuerpos bloqueadores.

El objetivo de la práctica es comparar la utilidad de varias de las pruebas utilizadas en el diagnostico serológico de la brucelosis.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	micropipeta	10- 50 ul	1
3	micropipeta	50- 100 ul	1



3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	Algodón	En torundas	2
4	Ligadura	Banda elástica	1
5	Gradilla	Metálica	1
6	Guantes		2
7	Piseta		1
8	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
9	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2
10	Láminas de vidrio		2

3.2. Reactivos

Ítem	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Cloruro de sodio		5 mL
2	Antígeno de rosa de bengala		5 ml
3	Control positivo		1ml
4	Control negativo		1ml



4. Indicaciones/instrucciones:

- Prepara los materiales necesarios.



- Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

Colocar 0,03 ml de suero problema sobre la lámina de vidrio. Repetir este procedimiento para los sueros control.

Colocar una gota (0,03 ml) de antígeno Rosa de bengala cerca de la gota de cada suero.

Mezclar bien el suero y el antígeno.

Hacer girar la lámina por 4 minutos.

Leer la prueba sobre fondo blanco.

6. RESULTADOS

27. La reacción positiva presenta grumos de aglutinación, grandes o pequeños, que debe observarse con el suero control positivo.
28. En una reacción negativa no hay evidencia en aglutinación, tal como deben observarse con el suero control negativo.
29. El suero problema que presente resultado positivo someterlo a pruebas confirmatorias como aglutinación en tubo o 2-mercaptoetanol.



AGLUTINACION EN TUBO

Además de ser muy sensible, la prueba de aglutinación en tubo es más exacta y reproducible que la prueba de aglutinación en lámina. Detecta la presencia de anticuerpos de las clases IgG e IgM.

Materiales

1. Antígeno para la prueba en tubo al 4,5%.
2. Suero problema.



3. Suero positivo.
4. Suero negativo.
5. Pipetas
6. Tubos de 13x100 mm.
7. Bocal con lejía

Procedimiento

1. Rotular los tubos del 1 al 5.
2. Con una pipeta de 0,2 ml depositar en el fondo del primer tubo 0,08 ml, en el segundo tubo 0,04 ml, en el tercer tubo 0,02 ml, en el cuarto tubo 0,01 ml y en el quinto tubo 0,005 ml.
3. Pipetear en forma similar los controles positivo y negativo.
4. Agregar 2 ml de antígeno fenolado (1 ml de antígeno más de 99 ml de solución salina al 0,85%, fenolada al 0,5%).
5. Incubarlas gradillas por 48 horas a 37°C en estufa o en baño María.

RESULTADOS

- Para la lectura de la prueba los tubos se leen contra un patrón de turbidez, cuya escala va desde negativo a 4+ de aglutinación.
- El título de la prueba está dado por la inversa de la dilución más alta que produce 2+ (50%) o más de aglutinación.
- Una prueba con un título de 100 es presuntiva.

PRUEBA DEL 2-MERCAPTOETANOL

La prueba del 2-mercaptoetanol es mejor indicadora de infección reciente o activa que la prueba de aglutinación en tubo. Se basa en la propiedad que tiene el 2-mercaptoetanol de inactivar la propiedad aglutinante de los anticuerpos de la clase IgM, detectando la presencia de IgG. Se recomienda efectuarla simultáneamente con la prueba de aglutinación en tubo.

Material

1. Antígeno para la prueba de 2-ME.
2. Suero problema.
3. Sueros controles.
4. Solución de 2-ME 0,1 molar.
5. Pipetas.
6. Tubos de 13x100 mm.
7. Bocal con lejía

1. Enumerar los tubos del 1 al 5.
2. Con una pipeta cargar el suero, depositar en el fondo del primer tubo 0,08 ml, en el segundo tubo 0,04 ml, en el tercer tubo 0,02 ml, en el cuarto tubo 0,01 ml y en el quinto tubo 0,05 ml.
3. Pipetear en forma similar los controles positivo y negativo.
4. Agregar 1 ml de solución 2-ME a cada tubo, agitar y dejar a temperatura ambiente por 30 minutos.
5. Agregar 1 ml de antígeno para la prueba de 2-ME (1 ml de antígeno más 49 ml de solución salina al 85%), a todos los tubos.



6. Incubar a 37°C por 48 horas.

RESULTADOS

- La prueba se lee como se ha descrito para la prueba de aglutinación en tubo.
- El título de la prueba está dado por la inversa de la dilución más alta que produce 2+ o más de aglutinación.
- Un título de 25 es considerado como positivo.

FENOMENO DE ZONA

Es la ausencia de aglutinación o la presencia de las aglutinaciones parciales en las diluciones bajas, y aglutinación completa en las diluciones altas, y está asociado con sueros que contienen un alto título de anticuerpos o que contienen anticuerpos bloqueadores.

Es causa de resultados falsos negativos, especialmente si no se realizan todas las diluciones de la prueba.

Reportar las diluciones donde ocurre el fenómeno de zona. El título del suero está dado por la inversa de la dilución más alta que aglutina.

ANTICUERPOS BLOQUEADORES

Los anticuerpos bloqueadores no solo son incapaces de producir aglutinación, sino que también la inhiben. Son anticuerpos divalentes que pertenecen a las clases IgA e IgG. Su presencia origina falsos negativos.

Materiales

1. Antígeno para la prueba en tubo.
2. Suero problema.
3. Pipeta.
4. Tubo de 13x100 mm.
5. Bocal con lejía.

Procedimiento

1. Colocar 0,04 ml del suero del paciente en un tubo.
2. Agregar 1 ml de antígeno para la prueba en tubo.
3. Agitar e incubar por 3 horas a 37°C.
4. Agregar 0,02 ml de suero positivo de título 100. También se pueden utilizar sueros positivos de mayor título, 400 o 200, en cuyo caso se utilizan 0,005 y 0,01 ml, respectivamente.
5. Agitar e incubar por 24 horas a 37°C.
6. Leer como la prueba en tubo.

RESULTADOS

- Si el paciente presenta anticuerpos bloqueadores, estos bloquean los determinantes antígenos del antígeno, por lo que al añadir el suero positivo este no puede reaccionar.



- Si existe aglutinación el suero es negativo a anticuerpos bloqueadores, y si no existe aglutinación el suero es positivo a anticuerpos bloqueadores y debe titularse (usando volúmenes de suero conocidos).
- Se considera un título de 100 como positivo.

7. Cuestionario

- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

8. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

9. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 10:

PRUEBA RÁPIDA DE HIV

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba , luego interpreta los resultados ,

1. Propósito /Objetivo_:

- Realizar pruebas inmunocromatográficas para HIV.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

Los virus de la inmunodeficiencia humana (HIV-1 y HIV-2) son los agentes causales del Síndrome de la Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA). Estos retrovirus son transmitidos por la exposición a ciertos fluidos corporales infectados, principalmente secreciones genitales y sangre o productos contaminados derivados de la sangre y por pasaje a través de la placenta. En individuos infectados con estos virus aparecen anticuerpos como respuesta del sistema inmunitario a la invasión viral. La detección de dichos anticuerpos es utilizada como herramienta de diagnóstico. Los Centros para el Control y la Prevención de Enfermedades de EE.UU. (CDC), en su iniciativa "Advancing HIV Prevention" (AHP) destacan la importancia de la utilización de pruebas rápidas de detección del HIV para facilitar el acceso al diagnóstico precoz en zonas de alta prevalencia, en individuos de alto riesgo o en zonas donde otros métodos de diagnóstico como ELISA, Western Blot o amplificación de ácidos nucleicos no estén disponibles. También son de gran utilidad en el momento del parto, especialmente para el diagnóstico de mujeres que no hayan sido controladas durante el embarazo. Por otra parte, estas pruebas rápidas constituyen una herramienta diagnóstica que puede desempeñar un papel importante en campañas de prevención y diagnóstico en entornos clínicos y no clínicos, facilitando de esta manera, la detección precoz de la infección.

FIN Y USO WL Check HIV 1+2: Es una prueba rápida que detecta conjuntamente la presencia de anticuerpos anti-HIV-1, antiHIV-1 grupo O y anti-HIV-2, destinada a diagnóstico clínico o estudios de campo. No está destinada como prueba de tamizaje de anticuerpos anti-HIV 1 y 2 para donantes de sangre y derivados.

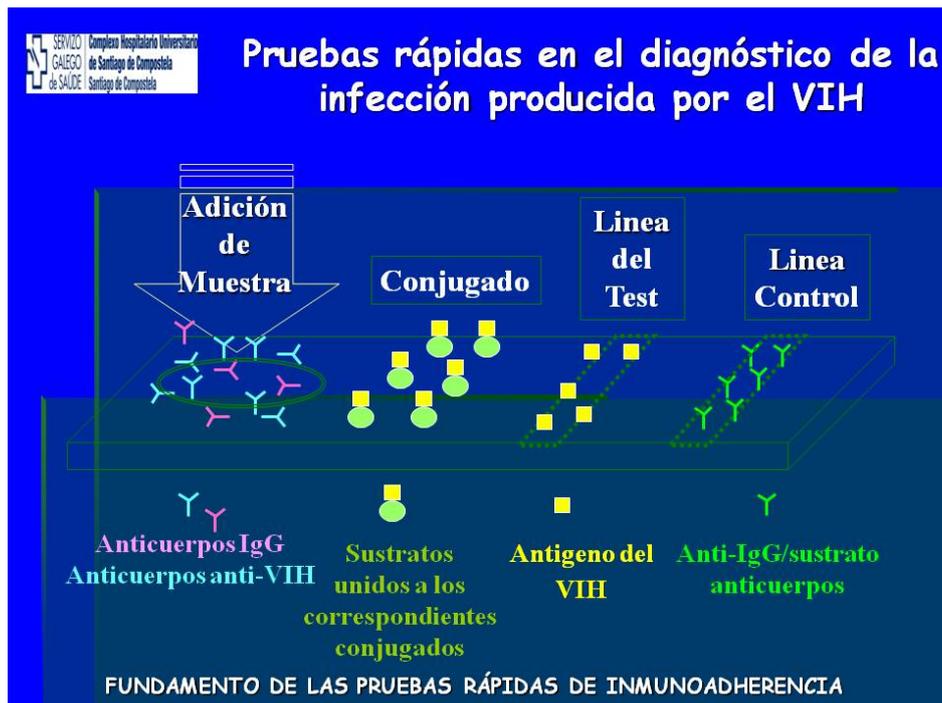
2. Fundamento Teórico



WL Check HIV 1+2 es un ensayo inmunocromatográfico "in vitro", de lectura visual, para la detección cualitativa de anticuerpos contra los virus HIV-1 y HIV-2 en suero, plasma y sangre entera. La prueba consta de un cassette plástico que contiene:

- una membrana de nitrocelulosa sensibilizada con antígenos recombinantes para HIV-1 (gp41) y HIV-2 (gp36) en la zona de prueba "T".
- un parche impregnado con antígenos recombinantes específicos para HIV-1 (gp41) y HIV-2 (gp36) conjugados a oro coloidal.

La muestra y el buffer se agregan en el pocillo de muestra "S" solubilizando y mezclándose con el conjugado de antígenos recombinantes. Seguidamente, esta mezcla migra por capilaridad a través de la membrana de nitrocelulosa. Si la muestra es reactiva, los anticuerpos anti HIV-1 y HIV-2 presentes, formarán un complejo con los antígenos conjugados a oro coloidal. Este complejo se unirá posteriormente a los antígenos inmovilizados en la zona de prueba "T" de la membrana de nitrocelulosa, formando así una línea de color rosa-rojo púrpura. La ausencia de dicha línea indica un resultado negativo. Como control de procedimiento, la prueba incluye una zona de control "C" de color celeste que cambia a color rosa-rojo púrpura tras el paso de la muestra. La ausencia de esta línea invalida los resultados.



REACTIVOS

Reactivo A: cassette plástico compuesto por una membrana de nitrocelulosa sensibilizada con antígenos recombinantes específicos para HIV-1 y HIV-2 y conjugado de antígenos recombinantes. Listo para usar.



Reactivo B: buffer borato de sodio 15 mM, azida 0,95 g/L, agente tensioactivo, pH = 9,1. Listo para usar.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	micropipeta	10- 50 ul	1
3	micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
3	algodón	En torundas	2
4	ligadura	Banda elástica	1
5	gradilla	Metálica	1
6	guantes		2
7	piseta		1

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Prueba rápida de HIV		1 mL



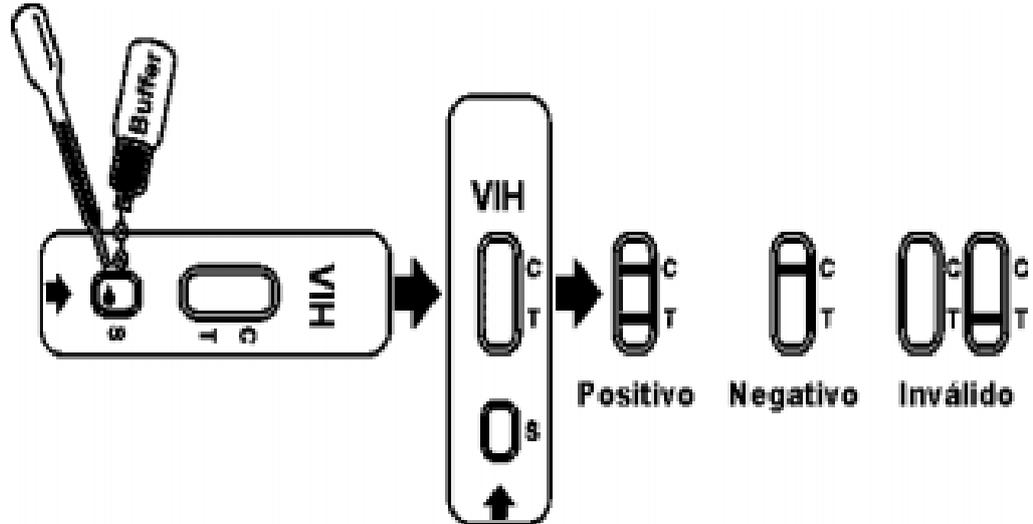


4. Indicaciones/instrucciones:

- Prepara los materiales necesarios.
- Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario
- **PRECAUCIONES**
 - - Leer el manual de instrucciones de manera completa antes de realizar el ensayo y seguir las instrucciones cuidadosamente.
 - - No realizar la prueba si el envase está dañado.
 - - No utilizar los reactivos después de la fecha de vencimiento indicada en el envase. - Los reactivos son para uso diagnóstico "in vitro".
 - - Esta prueba proporciona un resultado cualitativo y visual. Es necesaria una buena fuente de luz para la lectura de los resultados.
 - - No mezclar reactivos de diferentes lotes.
 - - No utilizar reactivos de otro origen.
 - - No tocar la membrana de nitrocelulosa con los dedos.
 - - Seguir las prácticas de seguridad biológica al utilizar muestras y reactivos
 - - Manipular todas las muestras de pacientes como potencialmente infecciosas.
 - - Utilizar guantes, guardapolvo y protección ocular.
 - - No pipetear con la boca. No comer, beber, fumar, utilizar maquillaje ni manejar lentes de contacto en los lugares donde se trabaje con estos materiales.
 - - Limpiar y desinfectar las salpicaduras de muestra o reactivos usando hipoclorito sódico (concentración final 5%) u otro desinfectante adecuado.
 - - Para inactivar el material empleado autoclavar durante 1 hora a 121o C. - Evitar la formación de burbujas en el pocillo de muestra "S" tanto al colocar la muestra como el Reactivo B.
 - - Al dispensar el Reactivo B descartar cualquier gota con burbuja.
 - - Durante la realización de la prueba, colocar el cassette sobre una superficie limpia, plana y sin vibraciones.
 - - No agitar el cassette durante la realización del ensayo.
 - - El cassette y el dispositivo para toma de sangre entera capilar, son descartables. No reutilizar. Desechar en recipientes destinados a residuos con riesgo biológico.
 - - El Reactivo B posee azida sódica en bajas concentraciones como conservante.
 - - Los reactivos y las muestras deben ser descartados de acuerdo a la normativa vigente.
- **ESTABILIDAD E INSTRUCCIONES DE ALMACENAMIENTO**
 - El kit es estable a 2-30o C hasta la fecha de vencimiento indicada en la caja. No congelar. En caso de almacenar refrigerado, asegurarse que el sobre alcance temperatura ambiente antes de ser utilizado, de lo contrario se favorecerá la humectación del contenido. El cassette debe permanecer en su sobre original sellado. No abrir el envoltorio hasta el momento de usar.
- **MUESTRA**
 - Suero, plasma y sangre entera obtenida por punción venosa o punción capilar
 - a) Recolección:
 - Recoger las muestras asépticamente y de manera tal de evitar hemólisis.



- - Suero: obtenido de sangre entera sin anticoagulantes. Separar el suero del coágulo inmediatamente para evitar hemólisis. Puede utilizarse suero obtenido en tubos con acelerador y gel separador.
- - Plasma: utilizar plasma recogido con EDTA, citrato o heparina.
- - Sangre entera (punción venosa): utilizar sangre recogida con EDTA, citrato o heparina.
- - Sangre entera (punción capilar): utilizar sangre recogida con el dispositivo descartable (sólo provisto en algunas presentaciones). Realizar la prueba inmediatamente. En caso de utilizar otro dispositivo, es responsabilidad del usuario validar el dispositivo de toma de sangre entera capilar.
- b) Estabilidad y almacenamiento:
 - - Suero y plasma: conservar a 2-10o C. En caso de no realizar la prueba dentro de los 5 días conservar la muestra a -20o C.
 - No es recomendable realizar múltiples ciclos de congelamiento y descongelamiento. Esto puede generar resultados erróneos. En caso de usar muestras congeladas, éstas deben ser homogeneizadas y centrifugadas antes de usar.
 - - Sangre (punción venosa): Puede almacenarse hasta 3 días entre 2-10°C. No congelar.
 - - Sangre (punción capilar): Utilizar inmediatamente. No congelar.
- c) Sustancias Interferentes: en sueros y plasmas enriquecidos, no se ha observado interferencia por:
 - - Hemólisis: hasta 1,1 g/dL de hemoglobina.
 - - Lipemia: hasta un equivalente de triglicéridos de 1500 mg/dL
 - - Bilirrubina: hasta 30 mg/dL.
 - - Ácido ascórbico: hasta 50 mg/dL.
- d) Transporte: si las muestras deben ser transportadas, embalar de acuerdo a las especificaciones legales relativas al envío de material infeccioso.
- **PROCEDIMIENTO**
 - 1- Los reactivos y las muestras deben estar a temperatura ambiente (18-30o C) antes de utilizar.
 - 2- Extraer el cassette de su sobre sellado inmediatamente antes de utilizar.
 - 3- Colocar el cassette sobre una superficie limpia, plana y sin vibraciones.
 - 4- Agregar la muestra sobre la superficie absorbente del pocillo de muestra "S".
 - PARA SUERO O PLASMA - Colocar 10 uL con micropipeta automática.
 - - Esperar 10-15 seg. hasta que se absorba la muestra.
 - - Agregar 3 gotas (100 uL) de Reactivo B en el pocillo de muestra "S".
 - - Iniciar el cronómetro.
 - **PARA SANGRE ENTERA**
 - - Colocar 20 uL con micropipeta automática.
 - * - Esperar 10-15 seg. hasta que se absorba la muestra.
 - - Agregar 3 gotas (100 uL) de Reactivo B en el pocillo de muestra "S".
 - - Iniciar el cronómetro.
 - 5- En cualquiera de los casos, leer los resultados entre los 10 y 20 minutos. No leer pasado los 20 minutos ya que pueden obtenerse resultados erróneos. Algunas muestras positivas reaccionan inmediatamente mientras que otras lo hacen más lentamente dentro del tiempo de lectura indicado. Debido a características particulares de algunas muestras, el color de fondo de la membrana puede quedar ligeramente rosado sin afectar la interpretación de los resultados.
- **INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:**



➤
10. Cuestionario

- ¿Cuál es el fundamento de la prueba?
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

7. Conclusiones

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

8. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 11:
PRUEBA SÉRICA Y GLOBULAR

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba , luego interpreta los resultados ,

1. Propósito /Objetivo_:

- Demostrar la presencia o ausencia de anticuerpos naturales anti A y anti B.

2. Fundamento Teórico

La prueba está basada en la presencia o ausencia de anticuerpos anti A y/o anti B en el suero.

La presencia de estos anticuerpos en la muestra tratada, pueden evidenciarse enfrentando células que expresen los antígenos A o B. La prueba inversa es una confirmación cruzada de la prueba celular o directa.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	Centrifuga		1
2	Micropipeta	10- 50 ul	1
3	Micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Tubos para toma de muestra	con anticoagulante	1
3	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
4	Algodón	En torundas	2
5	Ligadura	Banda elastica	1
6	Gradilla	Metálica	1
7	Guantes		2
8	Piseta		1
9	Tubos de vidrio	13x 100 mm	2
10	Tubos de vidrio	12x 75 mm	2
2	Láminas concaba		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
------	----------	----------------	----------



1	Cloruro de sodio		5 mL
2	Suero anti A		1 ml
3	Suero anti B		1ml
4	Suero anti D		1ml



4. Indicaciones/instrucciones:

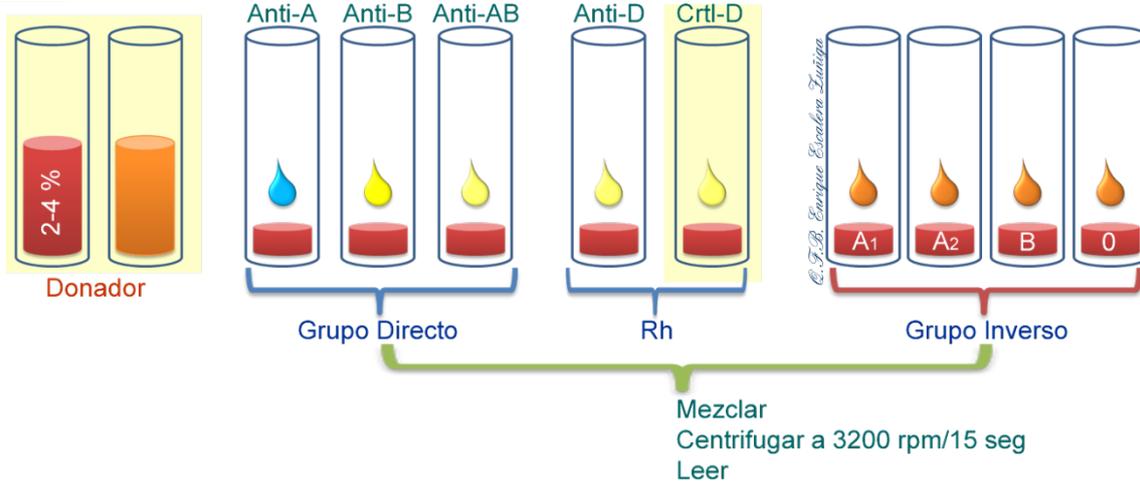
2.1 Prepara los materiales necesarios.

2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante

2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

- Marcar 4 tubos 12 x 75 mm, A, B, O y C (control)
- Dispensar en cada uno dos gotas de suero problema.
- Agregar a cada tubo correspondiente una gota de glóbulos rojos A, B, O y para el control.
- Centrifugar todos los tubos por 15 segundos a 3400 rpm
- Leer. observar si hay hemólisis y/o aglutinación en los tubos correspondientes, graduándolos en cruces 1+, 2+, 3+ y 4+, de acuerdo a la intensidad de la reactividad.
- Interpretar los resultados.



11. Cuestionario

- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

12. Conclusiones

- 7.1.....
- 7.2.....
- 7.3.....

13. Sugerencias y /o recomendaciones

-
-
-
-
-

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



CUARTA UNIDAD

Guía de laboratorio N° 12:

PRUEBA de H. pylori

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba, luego interpreta los resultados .

1. Propósito /Objetivo_:

- Demostrar la presencia o ausencia de anticuerpos contra H. Pylori por método de inmunocromatográficos.

2. Fundamento Teórico

La Prueba de H. pylori en Un Solo Paso en Placa (Suero/Plasma) es una inmunopueba cualitativa basada en el dispositivo de membrana, para la detección de anticuerpos H. pylori en suero y plasma. En este procedimiento de la prueba el IgG anti-humano se inmoviliza en la región correspondiente a la línea de la prueba del dispositivo. Después la muestra se agrega al pozo de la placa, este reacciona con el antígeno H. pylori recubierto con partículas en la prueba. La mezcla migra cromatográficamente a lo largo de la placa de la prueba e interactúa con el IgG anti-humano inmovilizado. Si la muestra contiene anticuerpos H. pylori una línea coloreada aparecerá en la región de la línea de prueba indicando un resultado positivo. Si la muestra no contiene H. pylori, no aparecerá ninguna línea coloreada en esta región indicando un resultado negativo. Como un procedimiento de control, siempre aparecerá una línea roja en la región de la línea de control si la prueba ha sido realizada correctamente. Si no aparece la línea coloreada en la línea de control, los resultados no son válidos.

SIGNIFICACIÓN CLÍNICA

El H. pylori es una bacteria pequeña de forma espiral que vive en la superficie del estómago y duodeno. Está implicada en la etiología de una variedad de enfermedades gastrointestinales incluyendo cáncer duodenal y gástrico, gastritis crónica y activa. Muestras subordinadas y costosas a Métodos de diagnóstico invasivos incluyen biopsias gástricas o duodenales seguidas por pruebas de ureasa (presuntiva), cultivos y/o coloraciones (teñido) histológicos. Las técnicas no invasivas incluyen la prueba de aliento de urea, la cual requiere equipos de



laboratorio costosos y una exposición moderada a la radiación y métodos serológicos. Los individuos infectados con *H. pylori* desarrollan anticuerpos, los cuales se correlacionan fuertemente con la infección de *H. pylori* confirmada histológicamente. La Prueba de *H. pylori* en Un Solo Paso en Placa (Suero/Plasma) es una prueba sencilla que utiliza una combinación de antígenos de *H. pylori* recubiertos por partículas e IgG antihumano para que cualitativa y selectivamente detecte anticuerpos *H. pylori* en suero o plasma.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

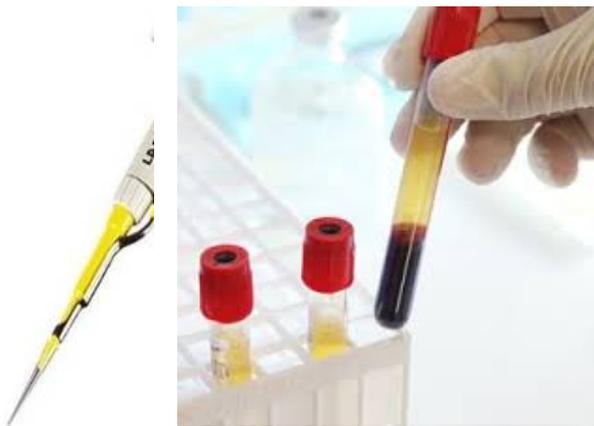
Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	micropipeta	10- 50 ul	1
3	micropipeta	50- 100 ul	1

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Tubos para toma de muestra	con anticoagulante	1
3	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
4	algodón	En torundas	2
5	ligadura	Banda elástica	1
6	gradilla	Metálica	1
7	guantes		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	antigenos <i>H. pylori</i> recubiertos en partículas e IgG anti-humano		5 mL



4. Indicaciones/instrucciones:

2.1 Prepara los materiales necesarios.



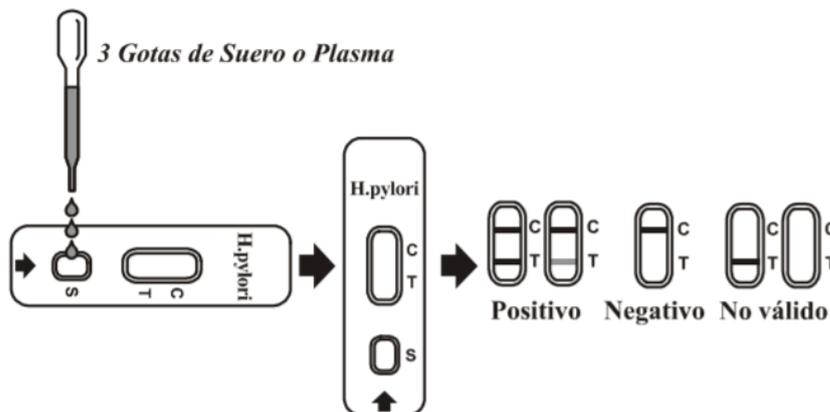
2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante

2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

Deje que la placa, la muestra de suero o plasma, y/o los controles a temperatura ambiente estable (15-30°C) antes de la prueba. 1. Lleve el empaque individual de la prueba a temperatura ambiente antes de abrirlo. Saque la prueba del empaque individual sellado y utilícelo tan pronto como sea posible. 2. Coloque la prueba en una superficie nivelada y limpia. Sujete el gotero verticalmente y transfiera tres gotas de suero o plasma (aproximadamente 100 µl) al pozo de la placa (S) de la prueba y empiece a tomar el tiempo. Evite burbujas de aire en el pozo de la placa (S). Vea las instrucciones abajo. 3. Espere hasta que aparezca la línea roja. El resultado debe ser leído a los 10 minutos. No lea el resultado después de 20 minutos.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS:



POSITIVO:* Aparición de dos líneas rojas distintas. Una línea roja debe estar en la región de la línea de control (C) y la otra línea roja debe estar en la región de la línea de prueba (T). *NOTA: La intensidad del color rojo en la región de la línea de prueba (T) variará dependiendo de las concentraciones de los anticuerpos H. pylori presentes en la muestra. Por consiguiente, cualquier oscurecimiento de la región de la línea roja de prueba se debe considerar como positivo. **NEGATIVO:** Una línea roja aparece en la región de la línea control (C). No aparece ninguna línea aparentemente ni roja ni rosada en la región de línea de prueba (T). **NO VÁLIDO:** La línea (C) de control no aparece. Las razones más probables para que falle la línea de control es que el volumen de muestra sea insuficiente o que las técnicas de procedimiento no se realizaron en forma adecuada. Revise el procedimiento y repita la prueba con un nueva placa



de prueba. Si los problemas persisten, no siga utilizando la placa de prueba y contacte su distribuidor local. CO

14. Cuestionario

- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

15. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

16. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 13

ENSAYO INMUNOENZIMÁTICOS (ELISA)

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba, luego interpreta los resultados .

1. Propósito /Objetivo_:

- Realizar pruebas por métodos de ELISA.

2. Fundamento Teórico

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 purificas, lo que aumenta el costo de las pruebas.

Fases de un ensayo ELISA

Las 4 fases de un ensayo ELISA son las siguientes:

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.





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 frío frente a una cantidad fija de antígeno marcado. Es el ensayo de competición del antígeno.



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



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).

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 sándwich.

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 sándwich: (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.

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Item	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	micropipeta	10- 50 ul	1
3	micropipeta	50- 100 ul	1
4	Lector de elisa		

3.2. Materiales

Item	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Tubos para toma de muestra	con anticoagulante	1
3	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
4	algodón	En torundas	2
5	ligadura	Banda elastica	1



6	gradilla	Metálica	1
7	guantes		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Kit de HIV por elisa		5 mL



4. Indicaciones/instrucciones:

- 2.1 Prepara los materiales necesarios.
- 2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- 2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

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: Co 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.

- Añada 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.

17. Cuestionario

- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

18. Conclusiones

7.1.....
.....

7.2.....
.....

7.3.....
.....

19. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.



Guía de laboratorio N° 14:

MARCADORES TUMORALES

Sección :Docente:

Fecha:/...../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Lee la guía de práctica para analizar la prueba, luego interpreta los resultados .

1. Propósito /Objetivo_:

- Reconocer los diferentes tipos de marcadores tumorales.

2. Fundamento Teórico

Los marcadores tumorales son sustancias biológicas o bioquímicas producidas o inducidas por las células tumorales o por el organismo en respuesta a su presencia. Aunque las presencias de niveles elevados de marcadores tumorales sugieren la presencia de un proceso neoplásico, es necesario confirmar la presencia del mismo mediante otras técnicas diagnósticas (por ejemplo, biopsia o pruebas de imagen). No obstante, tras el diagnóstico se inicia una nueva fase en la historia de una neoplasia, en la que es necesario obtener la máxima información posible para establecer el pronóstico, fijar el tipo de terapia adecuada, controlar la evolución clínica y establecer la eficacia del tratamiento, es en estas etapas donde los marcadores tumorales son de indudable utilidad para suministrar al clínico información fiable que ayude en la toma de decisiones terapéuticas. Para poder obtener la máxima información de los marcadores tumorales es imprescindible el planteamiento de estudios en el seno de grupos multidisciplinarios para estandarizar los protocolos de uso de marcadores tumorales. El objetivo de este trabajo es ayudar a los profesionales a la toma de decisiones en base a la determinación de marcadores tumorales de acuerdo con los estudios basados en la evidencia.



MARCADOR	FALSOS POSITIVOS	INDICACIONES
AFP	Enfermedades hepatobiliares Embarazo Neonatos Ataxia-Telangiectasia	Carcinoma hepatocelular Tumores germinales de testículo y ovario Cáncer gástrico
BHCG	Insuficiencia renal Gestación	Tumores trofoblásticos Tumores germinales de testículo y ovario
CA15-3	Insuficiencia renal Hepatopatías Anemia megaloblástica	Carcinomas de mama y ovario Incrementos en NCICP Linfomas
CA 19-9	Pancreatitis, colestasis Insuficiencia renal, Hepatopatías Patología gastrointestinal Endometriosis	Neoplasias digestivas (especialmente páncreas) Carcinoma mucinosos de ovario
CA 125	Derrames serosos Hepatopatías Insuficiencia renal	Carcinoma ovárico Carcinoma de endometrio Carcinoma pulmonares
CEA	Fumadores, hepatopatía Insuficiencia renal Colitis ulcerosa Enfermedad de Crohn	Neoplasias epiteliales (especialmente mama, pulmón tiroides, digestivas)
Cromogranina A	Insuficiencia renal, sepsis Gastritis atrófica Neumonía	Tumores neuroendocrinos
Cyfra 21.1	Cirrosis hepática Insuficiencia renal Hepatopatías Patología cutánea sistémica	Neoplasias epiteliales Mesotelioma Algunos linfomas y sarcomas.
Her2-Neu	Hepatopatía Insuficiencia renal Patología ginecológica	Cáncer de mama



TUMORAL	NORMAL	PROBABILIDAD ELEVADA (>95%)
AFP	<10 ng/ml	>75 ng/ml
CA15.3	<35 U/ml	>100 ng/ml
CA 19.9	<37 U/ml	>1000 ng/ml
CA 125	<35 U/ml	>500 ng/ml
CEA	<5 ng/ml	>25 ng/ml
Cyfra 21.1	<3,3ng/ml	>20 ng/ml
Her2-Neu	<15U/ml	>30 ng/ml
He4	<150 pmol/l	>450 pmol/l
PSA	<4 ng/ml	>20 ng/ml
SCC	<2,5 ng/ml	>5 ng/ml
NSE	<25 U/ml	>35 U/ml

3. Equipos, Materiales y Reactivos

3.1. Equipos

Ítem	Equipo	Característica	Cantidad
1	centrifuga		1
2	micropipeta	10- 50 ul	1
3	micropipeta	50- 100 ul	1
4	Lector de elisa		

3.2. Materiales

Ítem	Material	Característica	Cantidad
1	Tubos para toma de muestra	sin anticoagulante	1
2	Tubos para toma de muestra	con anticoagulante	1
3	Agujas N° 21 para extracción al vacío	Extracción al vacío	1
4	algodón	En torundas	2



5	ligadura	Banda elastica	1
6	gradilla	Metálica	1
7	guantes		2

3.2. Reactivos

Item	Reactivo	Característica	Cantidad
1	Kit de PSA por elisa		5 mL



4. Indicaciones/instrucciones:

- 2.1 Prepara los materiales necesarios.
- 2.2 Recuerda tomar la muestra de sangre sin anticoagulante
- 2.3. Anota los resultados e interpreta los resultados, además desarrolla el cuestionario

5. Procedimientos:

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: Co 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.

- Añada 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.

20. Cuestionario

- Mencione los fundamentos.
- ¿Qué utilidad tiene la prueba?

21. Conclusiones

7.1.....
7.2.....
7.3.....

22. Sugerencias y /o recomendaciones

.....
.....
.....
.....
.....
.....
.....

Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

Abbas A., Lichtman A., (2015) Inmunología celular y molecular. – octava edición. Madrid España.