

_____ Guía de Laboratorio

Inmunología Especial

Guía de Laboratorio
Inmunología Especial
Código:

Primera edición digital
Huancayo, 2022

De esta edición

© Universidad Continental, Oficina de Gestión Curricular
Av. San Carlos 1795, Huancayo-Perú
Teléfono: (51 64) 481-430 anexo 7361
Correo electrónico: recursosucvirtual@continental.edu.pe
<http://www.continental.edu.pe/>

Cuidado de edición
Fondo Editorial

Diseño y diagramación
Fondo Editorial

Todos los derechos reservados.

La *Guía de Trabajo*, recurso educativo editado por la Oficina de Gestión Curricular, puede ser impresa para fines de estudio.

Índice

Presentación	5
Guía de práctica 2	
Manejo de animales de experimentación	6
Guía de práctica 3	
Proceso de inmunización en animales de experimentación activando respuesta inmune humoral y celular	16
Guía de práctica 4	
Proceso de inmunización II en animales de experimentación activando respuesta inmune humoral y celular	23
Guía de práctica 5	
Evaluación de inmunización mediante titulación de anticuerpos	29
Guía de práctica 6	
Diagnóstico serológico de fiebre tifoidea, sífilis y brucelosis (antígenos febriles, VDRL, RPR, rosa de Bengala)	35
Guía de práctica 7	
Turbidimetría, nefelometría, de proteínas especiales	43
Guía de práctica 8	
Aislamiento de linfocitos T. y B. en donantes cadavéricos en cobayos y prueba serologica HLA clase I y clase II	49

Guía de práctica 9	
Inmunofluorescencia indirecta mediante la prueba de anticuerpos antinucleares (ANA)	54
Guía de práctica 10	
Enzimoimmunoanálisis (Elisa)	60
Guía de práctica 11	
Análisis de multiplicación enzimática (EMIT)	65
Guía de práctica 12	
Diagnóstico de marcadores infecciosos de hepatitis B y C	69
Guía de práctica 13	
Quimioluminiscencia para marcadores tumorales y hormonas	74
Guía de práctica 14	
Extracción de ADN y carga viral en VIH	79
Guía de práctica 15	
Taller de manejo de equipos de alta tecnología	84
Guía de práctica 16	
Control de calidad en automatización	88
Referencias	91

Presentación



Manejo de animales de experimentación

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3-4)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Tema

Manejo de animales de experimentación (conejo, cobayo, ratón albino y cuy).

II. Objetivo

Realizar el manejo de animales de experimentación, conocer las vías de inoculación y las leyes peruanas de manejo para producción de biológicos como anticuerpos específicos.

III. Equipos y materiales

A. Biológico

- Conejo macho adulto de la raza Nueva Zelanda
- Cuy andino de tamaño mediano
- Ratón albino

B. Médico clínico

- Sujetadores
- Mesas de superficies lisa

- Torundas de algodón
- Alcohol al 70 % o 96 %
- Xilol

C. De campo

- Alimento comercial para conejos en etapa adulta
- Jaulas metálicas o de cartón
- Alimento natural para animales de experimentación

D. De laboratorio

- Frascos de vidrio
- Refrigerador
- Centrífuga clínica a 5000 rpm
- Jeringa hipodérmica tuberculina

IV. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

V. Procedimiento experimental

El conejo es un mamífero roedor que en libertad se alimenta exclusivamente de hierbas y granos; su cuerpo está cubierto por un pelo espeso y suave. Los conejos tienen un temperamento asustadizo, son propensos al pánico, por eso su trato y transporte debe ser cuidadoso. Cuando se encuentran nerviosos pueden arañar con los

miembros posteriores, excepcionalmente, llegan a morder. Cuando se aloja a varios machos juntos en un periodo prolongado, por instinto tienden a pelearse por una jerarquía.

Los conejos pueden ser empleados para muchos propósitos, entre ellos:

- Para sangrado o inyecciones endovenosas se prefiere razas de orejas grandes.
- En la determinación de pirógenos de preparados farmacéuticos.
- En la preparación de antisueros.
- Para pruebas de toxicidad de drogas y productos biológicos.
- Pruebas rutinarias de diagnóstico.
- Prueba de irritantes cutáneos y oculares, debido a su alta sensibilidad para estos productos.
- En la investigación de cirugía cardiovascular y estudios de hipertensión, enfermedades infecciosas, teratología, arteriosclerosis y serología.
- El conejo es apropiado para estudios sobre reproducción, pues la ovulación no es espontánea, no hay anestro estacional, la gestación es corta y el semen se puede recolectar fácilmente. Se usan para el estudio de anticonceptivos orales.
- En investigación de enfermedades infecciosas e inmunológicas, por la alta y calidad y cantidad de sus anticuerpos.
- También se usan en serología y para *screening* de agentes embriológicos y teratogénicos.

- Entre otras aplicaciones también son usados para cría de moscas tsé-tsé.
- También se utiliza con fines pedagógicos para anatomía, fisiología experimental, nutrición, reproducción, embriología, etc. Centro Nacional de Productos Biológicos / INS 10 Es preferible utilizar razas medianas, ya que las pequeñas tienen orejas extremadamente cortas y las inoculaciones se hacen dificultosas. Por otro lado, las razas muy grandes son difíciles de manipular, además de ocupar cajas más grandes y consumir más alimentos.

VI. Manejo diario

Alimentación

Los animales deben ser alimentados con dietas apetitosas, no-contaminadas y nutricionalmente adecuadas, diariamente o según sus requerimientos particulares, a menos que el protocolo en el que están siendo empleados lo demande de otra manera. Los gerentes de las colonias de animales deben emplear su buen juicio al comprar, transportar, almacenar y manipular los alimentos para reducir al mínimo la introducción de enfermedades, parásitos y vectores potenciales de enfermedades (por ejemplo, insectos y otras plagas) y contaminantes químicos a las colonias animales.

Agua

Diariamente, los animales deben tener acceso a agua potable no contaminada y según sus necesidades particulares. La calidad y definición de agua potable puede variar según la localidad (Homburger y otros, 1993). Puede ser necesaria la determinación periódica del pH, dureza y contaminación química y microbiológica para ase-

gurar que la calidad del agua es aceptable, especialmente si los componentes normales del agua de una localidad dada pueden influir en los resultados del estudio en que se use esa agua. Cuando los protocolos experimentales requieren agua altamente pura, se le puede tratar o purificar para eliminar o reducir al mínimo la contaminación. Se debe considerar cuidadosamente la selección del tratamiento del agua porque muchas de ellas tienen el potencial de causar alteraciones fisiológicas, cambiar la microflora o alterar los resultados experimentales (Fidler, 1977; Hall y otros, 1980; Hermann y otros, 1982; Homberger y otros, 1993). Por ejemplo, la clorinación del agua suministrada puede ser útil para algunas especies, pero tóxico para otras (por ejemplo, animales acuáticos). Los utensilios para dar de beber, tales como las pipetas de los bebederos y las válvulas automáticas, se deben revisar diariamente para verificar un adecuado mantenimiento, limpieza y operación.

En ocasiones, los animales tienen que ser entrenados a utilizar los componentes de los sistemas de provisión automática. Es mejor cambiar bebederos que rellenarlos, debido a la potencial contaminación microbiológica cruzada; pero en caso de rellenar bebederos se debe tener cuidado de regresarlos a la misma jaula de donde fueron tomados.

Técnica

1. Se toma a cada uno de los animales para su demostración explicando el correcto manejo y transporte de los conejos
2. Se presenta al ratón albino para su conocimiento y cómo se debe manejar para cada propósito de uso en el laboratorio
3. Se toma y se presenta al Hámster en el manejo y desplazamiento para cada fin del manipuleo del animal de experimentación.

4. Se presenta al cobayo o cuy para demostrar su manejo y cuidado toda vez que el animal se utilizará para extracción del bazo y ganglios periféricos.
5. Se recomienda los cuidados de cada animal durante su manejo y uso en el Laboratorio de Inmunología Especial.



Conejos albinos raza Nueva Zelanda



Ratones albinos



Cuye o cobayo raza mestiza



Hámster

Recomendaciones para el cuidado del animal

El animal debe tener acceso a agua y comida y debe tener suficiente cama limpia o área no obstruida para moverse y descansar.

Siempre que sea apropiado, los animales sociales deben albergarse en pares o grupos más que individualmente, suponiendo que ello

no está contraindicado por el protocolo en cuestión y no implica un riesgo a los animales. Dependiendo de una variedad de factores ambientales y de conducta, los animales en grupos pueden necesitar mayor o menor espacio total por animal que individualmente.

Cuadro. Espacio recomendado para conejos, gatos, perros, primates y aves

Animal	Peso (kg)	Área de piso / animal (m ²)	Altura (cm ²)
Conejos	Menos de 2	0.14	35.6
	Hasta 4	0.27	35.6
	Hasta 5.4	0.36	35.6
	Más de 5.4	0.45 o más	35.6
Gatos	Menos o igual a 4	0.27	61.0
	Más de 4	0.36 o más	61.0
Perros (1)	Menos de 15	0.72	-
	Hasta 30	1.08	-
	Más de 30	0 o más	-
Palomas (2)	-	0.072	-
Codornices (2)	-	0.022	-
Gallinas (2)	Menos de 0.25	0.022	-
	Hasta 0.5	0.045	-
	Hasta 1.5	0.09	-
	Hasta 3.0	0.18	-
	Más de 3.0	0.27 o más	-

- (1) Estas recomendaciones pueden requerir modificaciones debido a la conformación corporal de los animales. Se recomienda que la altura de la jaula permita al animal permanecer en una posición cómoda y que el área mínima del piso sea igual al cuadrado de la suma de la longitud del perro en metros (de la punta de la nariz a la base de la cola) más 0.15 m.
- (2) La altura de la jaula debe ser suficiente para permitir al animal permanecer erecto con sus patas sobre el piso.

Todo transporte de animales, incluyendo el transporte interinstitucional, debe planearse para minimizar el tiempo de tránsito y el riesgo de zoonosis, proteger contra los extremos ambientales, evitar el hacinamiento, proveer comida y agua si es indicado y proteger

contra traumas físicos. Es inevitable cierto estrés relacionado con el transporte, pero se puede reducir atendiendo estos factores.

Una vez ya entendido el manejo de los animales se procede a la técnica:

- Manejar al conejo y colocarlo en posición decúbito ventral, sujetarlo bien, para exponer la parte de las orejas, desinfectar con torunda de algodón con alcohol al 70 % o 96 % la región externa de la oreja.

VII. Resultados

Los resultados que esperamos obtener deben tener en cuenta de que la dilución que muestre la aglutinación se expresa como el título recíproco de la dilución mayor, de esta manera debemos observar la presencia de aglutinación que puede presentarse de leve a intensa expresada como 1+, 2+, 3+ y 4+ en los primeros dos a tres minutos, dependiendo de la respuesta inmune del animal, por otra parte, esta puede desaparecer en la forma alterna de dilución del suero en la dilución mayor debido a una respuesta intensa manifestándose el fenómeno de zona.

Se recomienda realizar la prueba de aglutinaciones en ambientes donde la temperatura oscile entre 20 y 22 °C.

VIII. Conclusiones

IX. Referencias

- Office of the Federal Register National and Records Administration. (1992). Code of Federal Regulations. Title 9, Animals and Animal Products. Government Printing Office.
- Schaumburg, I. (1995). In veterinary technology: AVMA, Membership Directory and Resource Manual (44th ed., pp. 236-240.). AVMA.
- Smith, A. (1988). *Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio: El ratón* (3.^o ed.). Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y OMS.
- Tur-Mari, J. A. y Orellana-Muriana, J. M. (Eds.). (2000). *Animal research and welfare: a partnership. FELASA-ICLAS Joint Meetitn, 7th symposium, Palma de Mallorca 26-28 May 1999*. Laboratory Animals.

Proceso de inmunización en animales de experimentación activando respuesta inmune humoral y celular

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3-4)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Discrimina el comportamiento de los antígenos mediante un proceso de inmunización en animales de experimentación.

II. Equipos y materiales

A. Biológico

- Conejo macho adulto de la raza Nueva Zelanda
- Antígeno inactivado de... suspensión de glóbulos rojos al 5 %

B. Médico clínico

- Jeringas desechables de 1.0 ml, con agujas calibre 24 y 26 pulgadas
- Torundas de algodón
- Alcohol al 70 % o 96 %
- Tubos estériles sin anticoagulante

C. De campo

- Alimento comercial para conejos en etapa adulta
- Jaulas metálicas

D. De laboratorio

- Congelador -20 °C
- Refrigerador
- Centrífuga clínica a 5000 rpm
- Luz para aglutinaciones
- Termómetro de 0 a 100 °C
- Solución salina
- Crioviales

III. Notas de seguridad

Respetar las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

El desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular tiene como consecuencia la producción de anticuerpos y activación de linfocitos TCD4 cooperadores, TCD8, como respuesta del organismo a un antígeno inactivado, ya sea por métodos físicos o químicos para elaborar cierto tipo de vacunas. Los antígenos no

inactivados se denominan antígenos activos modificados ya que han sido modificados en su virulencia y patogenicidad mediante procedimientos de laboratorio, pero conservan su viabilidad para multiplicarse al ser aplicados como vacunas en los animales.

El desarrollo de la respuesta inmune se caracteriza por dos fases: una respuesta o fase primaria y una respuesta secundaria o de memoria. El modelo de laboratorio desarrollado en conejo donador y ante el tipo de antígeno utilizado en esta práctica pretende ilustrar el desarrollo de estas fases y la posterior determinación de los niveles séricos de anticuerpos en los diferentes días durante el período de observación experimental.

Para ello debemos seguir los siguientes pasos:

Recomendaciones para el cuidado del animal

El animal debe tener acceso a agua y comida y debe tener su cama limpia o el área no obstruida para moverse y descansar.

Siempre que sea apropiado, los animales sociales deben albergarse en pares o grupos más que individualmente, suponiendo que ello no está contraindicado por el protocolo en cuestión y no implica un riesgo a los animales. Dependiendo de una variedad de factores ambientales y de conducta, los animales en grupos pueden necesitar mayor o menor espacio total por animal que individualmente.

Cuadro. Espacio recomendado para conejos, gatos, perros, primates y aves

Animal	Peso (kg)	Área de piso / animal (m ²)	Altura (cm ²)
Conejos	Menos de 2	0.14	35.6
	Hasta 4	0.27	35.6
	Hasta 5.4	0.36	35.6
	Más de 5.4	0.45 o más	35.6
Gatos	Menos o igual a 4	0.27	61.0
	Más de 4	0.36 o más	61.0
Perros (1)	Menos de 15	0.72	-
	Hasta 30	1.08	-
	Más de 30	0 o más	-
Palomas (2)	-	0.072	-
Codornices (2)	-	0.022	-
Gallinas (2)	Menos de 0.25	0.022	-
	Hasta 0.5	0.045	-
	Hasta 1.5	0.09	-
	Hasta 3.0	0.18	-
	Más de 3.0	0.27 o más	-

- (1) Estas recomendaciones pueden requerir modificaciones debido a la conformación corporal de los animales. Se recomienda que la altura de la jaula permita al animal permanecer en una posición cómoda y que el área mínima del piso sea igual al cuadrado de la suma de la longitud del perro en metros (de la punta de la nariz a la base de la cola) más 0.15 m.
- (2) La altura de la jaula debe ser suficiente para permitir al animal permanecer erecto con sus patas sobre el piso.

Todo transporte de animales, incluyendo el transporte intrainstitucional, debe planearse para minimizar el tiempo de tránsito y el riesgo de zoonosis, proteger contra los extremos ambientales, evitar el hacinamiento, proveer comida y agua si es indicado y proteger contra traumas físicos. Es inevitable cierto estrés relacionado con el transporte, pero se puede reducir atendiendo estos factores.

Una vez ya entendido el manejo de los animales se procede a la técnica:

- Manejar al conejo y colocarlo en posición decúbito ventral, sujetarlo bien, para exponer la parte de las orejas, desinfectar con torunda de algodón con alcohol al 70 % o 96 % la región externa de la oreja.



- Extraer aproximadamente 5.0 ml de sangre por punción de la vena marginal de la oreja y colocar la muestra en tubo estéril y dejar que coagule para centrifugar la muestra de sangre a 2500 rpm durante 10 minutos y obtener posteriormente el suero bajo condiciones de esterilidad en criovial estéril.
- En tubos, obtener 5 ml de sangre el día 7, 10, 13 y 15 y procesar el suero como se mencionó arriba para obtener el suero y distribuirlo en alícuotas en crioviales estériles con la identificación de la fecha correspondiente.
- Congelar las muestras a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

V. Resultados

Los resultados que esperamos obtener sueros límpidos libre de hemólisis de un volumen no menor de 5 ml para utilizar en la práctica de titulación de anticuerpos a partir de sueros concentrados realizando diluciones seriadas guardando a una congeladora de $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de la siguiente practica.

VI. Conclusiones

VII. Referencias

Canadian Council on Animal Care. (1980). *Guide to the care and use of experimental animals* (Vol. 1). Canadian Council on Animal Care.

Kindt, T.J., Goldsby, R. A., & Osborne, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby* (6.th ed.). McGraw-Hill.

Tizard, I. R. (2004). *Veterinary immunology, an introduction* (6th ed.). Elsevier.

Guía de práctica 4

**Proceso de inmunización II en animales de experimentación
activando respuesta inmune humoral y celular**

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Discrimine el comportamiento de los antígenos mediante un proceso de inmunización en animales de experimentación. Observe cambios fisiológicos en el animal de experimentación.

II. Equipos y materiales**A. Biológico**

- Conejo macho adulto de la raza Nueva Zelanda
- Antígeno inactivado de suspensión de glóbulos rojos al 5 %

B. Médico clínico

- Jeringas desechables de 10 ml, con agujas calibre 24 y 26 pulgadas
- Torundas de algodón
- Alcohol al 70 % o 96 %
- Tubos estériles sin anticoagulante

C. De campo

- Alimento comercial para conejos en etapa adulta
- Jaulas metálicas

D. De laboratorio

- Congelador -20 °C
- Refrigerador
- Centrífuga clínica a 5000 rpm
- Luz para aglutinaciones
- Termómetro de 0 a 100 °C
- Solución salina
- Crioviales.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

El desarrollo de la respuesta inmune humoral y celular tiene como consecuencia la producción de anticuerpos y activación de linfocitos TCD4 cooperadores, TCD8, como respuesta del organismo a un antígeno inactivado, ya sea por métodos físicos o químicos para elaborar cierto tipo de vacunas. Los antígenos no inactivados se denominan antígenos activos modificados ya que han sido modificados en su virulencia y patogenicidad mediante procedimientos de

laboratorio, pero conservan su viabilidad para multiplicarse al ser aplicados como vacunas en los animales.

El desarrollo de la respuesta inmune se caracteriza por dos fases: una respuesta o fase primaria y una respuesta secundaria o de memoria. El modelo de laboratorio desarrollado en conejo donador y ante el tipo de antígeno utilizado en esta práctica pretende ilustrar el desarrollo de estas fases y la posterior determinación de los niveles séricos de anticuerpos en los diferentes días durante el período de observación experimental.

Para ello, debemos seguir los siguientes pasos:

V. Preparación de Suspensión de Glóbulos rojos al 5 %

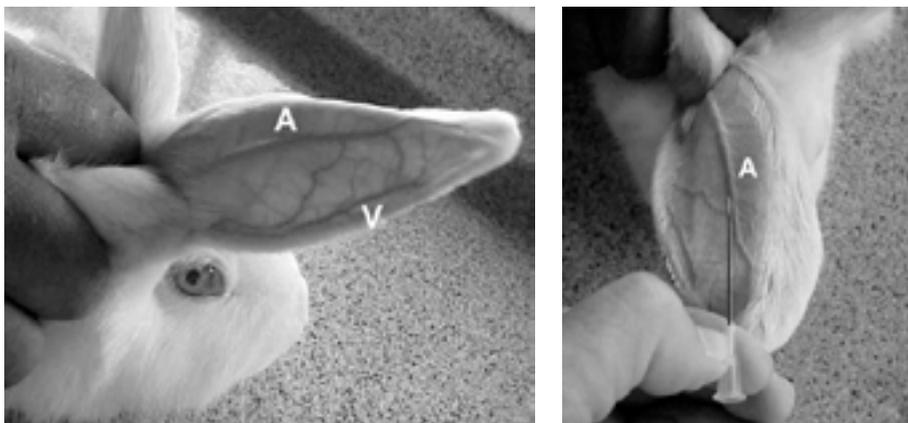
Técnica

1. Se toma sangre total anticoagulada con CPDA 1 del grupo A y B, respectivamente. En un tubo de tamaño de 13 × 100 mm.
2. Agregar c.s.p. tubo lleno de cloruro de sodio al 0,9 %.
3. Centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos y decantar el sobrenadante.
4. Repetir por tres veces el lavado.
5. Finalmente preparar la suspensión de glóbulos rojos al 5 % agregando en tubo limpio y seco 01 una gota de glóbulos rojos puros y lavados completando con 19 gotas de cloruro de sodio al 0,9 %
6. Inocular al conejo la dosis según el día que corresponde.

Recomendaciones para el sangrado del animal

- Manejar al conejo y colocarlo en posición decúbito ventral, sujetarlo bien, para exponer la parte de las orejas, desinfectar con torunda de algodón con alcohol al 70 % o 96 % la región externa de la oreja.

Figura 1. Sangría en conejo a través de la arteria central de la oreja.



Nota: A la izquierda se señalan la arteria central (A), utilizada para la sangría, y la vena marginal (V), utilizada para la inyección intravenosa. A la derecha se muestra la forma para realizar la punción de la arteria, en forma muy superficial, con una aguja calibre 22 o 20 sin jeringa. La sangre se recoge por goteo libre en un tubo.

- Extraer aproximadamente 5.0 ml de sangre por punción de la vena marginal de la oreja y colocar la muestra en tubo estéril y dejar que coagule para centrifugar la muestra de sangre a 2500 rpm durante 10 minutos y obtener posteriormente el suero bajo condiciones de esterilidad en criovial estéril.
- Extraer en los días 7,10,13 y 15 del proceso de inmunización.
- Congelar las muestras a -20°C a una congeladora vertical.

- Guardar los 4 sueros colectados previamente rotulados e identificados en los días de los sangrados.

Cuadro. Pasos para la obtención de un antisuero mediante inmunización.

1	2	3	4	5	6
Preparación del inmunógeno	Inmunización	Seguimiento y evaluación de la respuesta (sangrías de prueba)	Sangría final	Evaluación del antisuero	Purificación de los anticuerpos de interés

VI. Resultados

Crioviales debidamente identificados con un volumen no menor de 0.5 ml por cada frasco, las muestras no deben presentar hemólisis lipemia se debe congelar a una temperatura menor o igual a -20 °C en una congeladora vertical del servicio de inmunología y/o laboratorio de la universidad.

VII. Conclusiones

VIII. Referencias bibliográficas

Abbas, A. K.; Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (1994). *Cellular and Molecular Immunology*, 457 pp. Filadelfia, W.B. Saunders Company.

Adams, R. L. P. (1990). *Cell Culture for Biochemists*, 364 pp. Ámsterdam: Elsevier.

- Alape-Girón, A.; Gustafsson, B.; Lomonte, B.; Thelestam, M. y Gutiérrez, J. M. (1994). "Immunochemical characterization of *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom with monoclonal and polyclonal antibodies". *Toxicon*, n.º 32, pp. 695-712.
- Alape-Girón, A.; Lomonte, B.; Gustafsson, B.; Da Silva, N. J. y Thelestam, M. (1994). "Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms". *Toxicon*, n.º 32, pp. 713-723.
- Alape-Girón, A.; Miranda-Arrieta, K.; Cortés-Bratti, X.; Stiles, B. G. y Gutiérrez, J. M. (1997). "A comparison of in vitro methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*". *Toxicon*, n.º 35, pp. 573-581.
- Canadian Council on Animal Care. (1980). *Guide to the care and use of experimental animals* (Vol. 1). Canadian Council on Animal Care.
- Kindt, T.J., Goldsby, R. A., & Osborne, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby* (6th ed.). McGraw-Hill.
- Tizard, I. R. (2004). *Veterinary immunology, an introduction* (6th ed.). Elsevier.

Guía de práctica 5

Evaluación de inmunización mediante titulación de anticuerpos

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Calcular la cantidad de Anticuerpos producidos por el sistema inmunológico humoral del conejo, el cual fue previamente inoculado con antígenos en diferentes concentraciones y dosis seriadas durante 15 días.

II. Equipos y materiales

Biológico

- Muestras de sangre tomadas el día 7, 10, 13 y 15 posterior a la inoculación.
- Preparación de glóbulos rojos al 5% del grupo A

De laboratorio

- Centrífuga clínica a 5000 rpm.
- Luz para aglutinaciones.
- Solución salina.

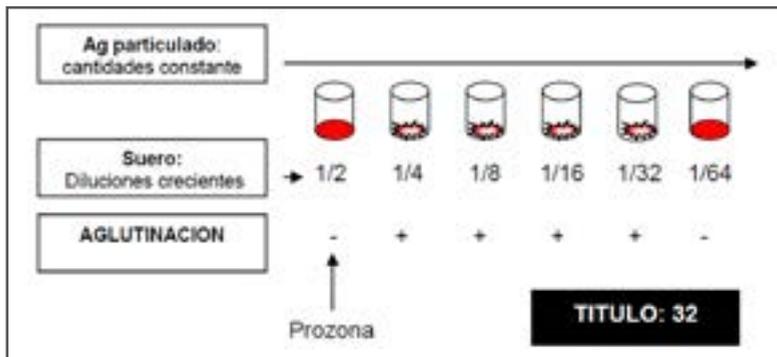
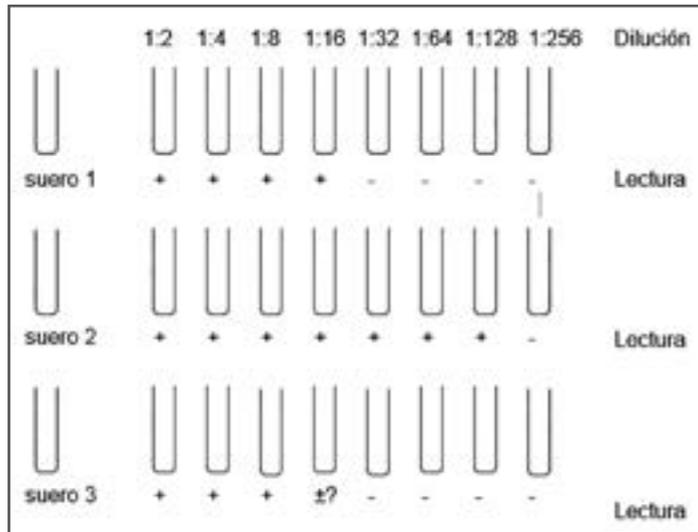
- Tubos.
- Plumón indeleble.
- Gradillas.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

La titulación y detección de anticuerpos se hace evidente gracias a las reacciones de aglutinación directa en distintos fluidos biológicos, para este caso suero. Es importante destacar que no es posible determinar la concentración de Ac sino que, en el mejor de los casos, será posible calcular un título de Ac. Para ello, se realiza la centrifugación de diluciones seriadas del suero del conejo con cantidades constantes de Ag (glóbulos rojos al 5 % del grupo A) y se elige arbitrariamente como título la inversa de la máxima dilución de suero que produce aglutinación visible. En determinadas muestras en las que existe una gran cantidad de Ac es posible que a diluciones bajas (es decir, a altas concentraciones de suero) no se observe aglutinación. Este fenómeno se denomina efecto "prozona" y se debe a que en exceso de Ac se forman preferentemente complejos Ag-Ac solubles (como los formados en la zona de exceso de Ac en la curva de precipitación). En este caso, el título de Ac sigue siendo la máxima dilución de suero que produce aglutinación visible.



Procedimiento

Para el suero del séptimo día de posinoculación.

- Rotular 10 tubos seriada mente con el nombre de los títulos a realizar en cada uno de ellos (por ejemplo: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, etc.)
- Colocarlos en una gradilla en orden ascendente.
- Dispensar en cada uno de ellos $100 \mu\text{l}$ de CIna.

- En el primer tubo (1/2) agregar también 100 μl de la suspensión de Glóbulos Rojos al 5 % del grupo A.
- Coger 100 μl del primer tubo y dispensar en el segundo, homogenizar y volver a coger 100 μl y dispensar en el tercer tubo, repetir este procedimiento hasta llegar al último tubo.
- Centrifugar a 3400 rpm \times 15 segundos.
- Observar el botón hemático y anotar los dils.

Repetir los pasos para las muestras séricas de los días 10, 13 y 15 posterior a la inoculación.

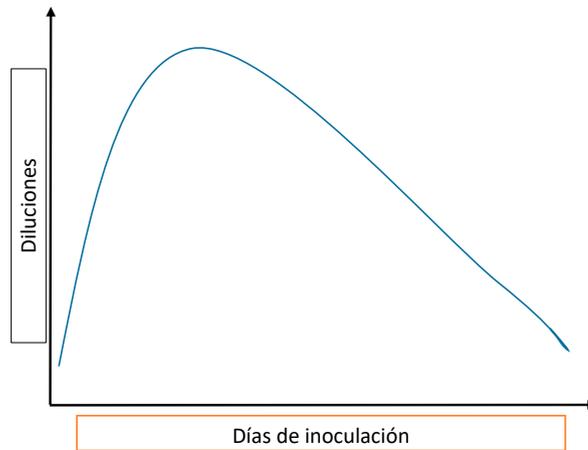
V. Resultados

Los resultados que esperamos obtener deben tener en cuenta que la dilución que muestre la aglutinación se expresa como el título recíproco de la dilución mayor, de esta manera debemos observar la presencia de aglutinación que puede presentarse de leve a intensa expresada como 1+, 2+, 3+ y 4+, tener en cuenta que esta puede desaparecer en la forma alterna de dilución del suero en la dilución mayor debido a una respuesta intensa manifestándose el fenómeno de zona.

Se recomienda realizar la prueba de aglutinaciones en ambientes donde la temperatura oscile entre 20 y 22 °C.

Realizar una curva para observar el pico máximo de dils en base a los días que transcurrieron de la inoculación.

Ejemplo:



VI. Conclusiones

VII. Referencias

Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (2022). *Cellular and Molecular Immunology* (10th ed.). Elsevier.

Adams, R. L. P. (1990). *Cell Culture for Biochemists*. Elsevier.

Alape-Girón, A., Gustafsson, B., Lomonte, B., Thelestam, M. y Gutiérrez, J. M. (1994). Immunochemical characterization of *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom with monoclonal and polyclonal antibodies. *Toxicon*, 32(6), 695-712.

Alape-Girón, A., Lomonte, B., Gustafsson, B., Da Silva, N. J. y Thelestam, M. (1994). Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon*, 32(6), 713- 723.



- Alape-Girón, A., Miranda-Arrieta, K., Cortés-Bratti, X., Stiles, B. G. y Gutiérrez, J. M. (1997). A comparison of in vitro methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Toxicon*, 35(4), 573-581.
- Canadian Council on Animal Care. (1980). *Guide to the care and use of experimental animals* (Vol. 1). Canadian Council on Animal Care.
- Dresser, D.W. (1986). Immunization of experimental animals. En D. Weir, L. Herzenberg, C. Blackwell & L. Herzenberg. *Handbook of Experimental Immunology* (p. 8, Vol.1). Blackwell.
- Engvall, E. (1980). Enzyme immunoassay: ELISA and EMIT. *Methods Enzymol*, 70(A), 419-439.
- Fahey, J.L. y McKelvey, E.M. (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immuno*, 94, 84-90.
- Freshney, R. I. (1992). *Animal Cell Culture: A Practical Approach* (2nd ed.). IRL Press.
- Goding, J. W. (1986). *Monoclonal antibodies: principles and practice*, Academic Press.
- Kindt, T.J., Goldsby, R. A., & Osborne, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby* (6th ed.). McGraw-Hill.
- Tizard, I. R. (2004). *Veterinary immunology, an introduction* (6th ed.). Elsevier.

Guía de práctica 6

**Diagnóstico serológico de fiebre tifoidea, sífilis y brucelosis
(antígenos febriles, VDRL, RPR, rosa de Bengala)**

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de laboratorio de inmunología básica mediante pruebas por principio de aglutinación comprendiendo la interacción antígeno y anticuerpo; para el diagnóstico de salmonelosis, brucelosis y sífilis.

II. Equipos y materiales

Biológico

- Suero sanguíneo.
- Plasma sanguíneo.

De laboratorio

- Aglutinoscopio.
- Microscopio binocular.
- Láminas de vidrio cóncavas.

- Tarjetas de reacción por floculación.
- Reactivos para:
 - Antígenos febriles.
 - Rosa de Bengala.
 - RPR-REAGIN.
- Pipetas automáticas graduables.
- Punteras.
- Baguetas.
- Manuales de procedimientos técnicos.
- Insertos de cada reactivo para su buen uso.
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Procedimiento

1. Técnica rápida en placa

Colocar en una placa una gota (50 μ l) de suero y agregar una gota (50 μ l) de suspensión de antígeno.

Mezclar y agitar la placa en forma circular durante 2 minutos.

Observar la presencia o ausencia de aglutinación utilizando una luz indirecta sobre fondo oscuro.

2. Titulación rápida en placa

1. Dividir una placa de vidrio en sectores de 4 centímetros cuadrados aproximadamente.
2. Empleando las micropipetas apropiadas colocar en estos sectores 80 μ l, 40 μ l, 20 μ l, 10 μ l y 5 μ l de suero límpido. 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.

3. Interpretación de los resultados

- 4+: todos los microorganismos aglutinan.
- 3+: aglutinan aproximadamente el 75 %.
- 2+: aglutinan aproximadamente el 50 %.
- 1+: aglutinan aproximadamente el 25 %.

Negativo: no aparece aglutinación.

Técnica I: se indica solamente positivo o negativo.

Técnica II: el título se considerará la última dilución que da aglutinación del 50 % (+ +). Los resultados obtenidos en la titulación en placa se aproximan a los de la prueba en tubo descrita en Bennett, C.W (ver Bibliografía),

Considerando las diluciones como se muestra a continuación:

Volumen de Suero Dilución aproximada en (ml) la prueba en tubo

0,08 1: 20

0,04 1: 40

0,02 1: 80

0,01 1: 160

0,005 1: 320

R.P.R. REAGINAS

Procedimiento

1. Prueba cualitativa

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y la muestra antes de realizar el ensayo. En cada uno de los círculos de la tarjeta de reacción colocar con un gotero plástico provisto:

Muestra o Controles 1 gota (50 μ l) Con el extremo cerrado del gotero distribuir la muestra uniformemente en todo el círculo.

Con el gotero metálico provisto, en posición vertical, agregar en el centro del círculo: Reactivo A 1 gota (17 μ l) SIN MEZCLAR, hacer rotar horizontalmente la tarjeta de reacción en forma manual o con agitador rotativo a 100 rpm durante 8 minutos. Observar la presencia o ausencia de aglutinación al cabo de este tiempo. Tiempos de lectura mayores pueden dar lugar a falsos resultados.

2. 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.

3. Interpretación de los 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.

ROSA DE BENGALA

Principio del método

El Rosa de Bengala es una técnica de aglutinación en porta para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-Brucela

en suero humano. La suspensión bacteriana y coloreada, es aglutinada por anticuerpos IgG o IgM presentes en el suero del paciente.

Procedimiento

- **Método cualitativo**

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. La sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
2. Depositar 50 μL de la muestra a ensayar y una gota de cada uno de los controles Positivo y Negativo, sobre círculos distintos de una porta.
3. Mezclar el reactivo de R. de Bengala vigorosamente o con el agitador vórtex antes de usar. Depositar una gota (50 μL) junto a cada una de las gotas anteriores.
4. Mezclar las gotas con un palillo, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear palillos distintos para cada muestra.
5. Situar la porta sobre un agitador rotatorio a 80-100 rpm durante 4 minutos. El exceso de tiempo de agitación puede originar la aparición de falsos positivos.

- **Método semicuantitativo**

1. Realizar diluciones dobles de la muestra en solución salina 9 g/L.
2. Proceder para cada dilución, como en la prueba cualitativa.

Lectura e interpretación

Examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar el porta del agitador. La presencia de aglutinación indica una concentración de anticuerpos anti-Brucela igual o superior a 25 UI/mL.

En el método semicuantitativo, se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

Cálculos

La concentración aproximada de anticuerpos anti-Brucella en la muestra del paciente se obtiene de la siguiente manera: $25 \times \text{Título de anti-Brucella} = \text{UI/ML}$.

Valores de referencia

Hasta 25 IU/mL. Es recomendable que cada laboratorio establezca sus propios valores de referencia.

Características del método

1. Sensibilidad analítica: 25 (± 5) UI/mL, en las condiciones descritas en el ensayo.
2. Efecto prozona: No se observa efecto prozona hasta valores de 1000 UI/mL.
3. Sensibilidad diagnóstica: 100 %.
4. Especificidad diagnóstica: 98 %.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Referencias

Alton, G. C. (1988). *Techniques for Brucellosis Laboratory*. INRA.

Ariza, J. (1996). Brucellosis. *Current Opinion in Infectious Diseases*, 9, 126-131.

Consejo Ejecutivo. (1958). Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en Brucelosis: Tercer informe. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/105730>

Young, D. S. (1995). *Effects of drugs on clinical laboratory test* (4th ed.). AACC Press.

Young, E. J. (1995). An Overview of Human Brucellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 21(2), 283-290.

Guía de práctica 7

Turbidimetría, nefelometría, de proteínas especiales

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de laboratorio de inmunología especial en el estudio de las proteínas especiales: PCR, FR, ASO y Microalbuminuria, C3, C4, Inmunoglobulina.

II. Equipos y materiales

A. Biológico

- suero sanguíneo
- plasma sanguíneo.

B. De laboratorio

- Centrífuga para tubos
- Analizador fotómetro de turbidimetría
- Cabina de flujo laminar
- Pipetas

- Cubetas de reacción
- Reactivos de diluciones de diversas de proteínas especiales
- Cloruro de sodio
- Proteína C Reactiva
- Factor reumatoideo
- Complemento C3
- Complemento C4
- Microalbuminuria
- Inmunoglobulinas IgA, IgM, IgG
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción y de segregación de residuos sólidos.

IV. Procedimiento experimental

Principios y fundamentos del ensayo

Las pruebas de las proteínas especiales que aplican el principio de turbidimetría reaccionan con el anticuerpo específico formando inmunocomplejos insolubles. La turbidez provocada por estos inmunocomplejos es proporcional a la concentración del analito proteína en la muestra y puede medirse espectrofotométricamente mediante estos complejos que sustentan la turbidimetría.

Procedimiento

1. Procedimiento de la preanalítica en centrifugación del tubo primario

Colocar en una centrifuga de tubos a una velocidad de 2500 rpm durante 10 minutos.

2. Programación en el analizador del fotómetro

1. Dividir una placa de vidrio en sectores de 4 centímetros cuadrados aproximadamente.
2. Empleando las micropipetas apropiadas colocar en estos sectores 80 μ l, 40 μ l, 20 μ l, 10 μ l y 5 μ l de suero límpido. 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.

Interpretación de los resultados

4+: todos los microorganismos aglutinan.

3+: aglutinan aproximadamente el 75 %.

2+: aglutinan aproximadamente el 50 %.

1+: aglutinan aproximadamente el 25 %.

Negativo: no aparece aglutinación.

Técnica I: se indica solamente positivo o negativo.

Técnica II: el título se considerará la última dilución que da aglutinación del 50 % (++) . Los resultados obtenidos en la titulación en placa se aproximan a los de la prueba en tubo descrita en Bennett, C. W (ver Bibliografía).

Considerando las diluciones como se muestra a continuación:

PROCEDIMIENTO

Curva de calibración

En tubos de Kahn debidamente marcados colocar: **PCR Calibrador en serie (1; 3; 5; 6; 7; 8)**

80 μ l **Reactivo A** 1000 μ l

Homogeneizar e incubar 5 minutos a 37 °C. Leer la absorbancia de cada Calibrador a 340 nm (DO_1) llevando el aparato a cero con agua destilada. Luego agregar:

Reactivo B 200 μ l

Homogeneizar. Incubar 5 minutos exactos a 37 °C e inmediatamente leer la absorbancia a 340 nm (DO_2), llevando el aparato a cero con agua destilada. Calcular la diferencia de absorbancia ($\Delta A = DO_2 - DO_1$) para cada calibrador.

Cálculo de los resultados

Calcular la diferencia de absorbancia ($\Delta A = DO_2 - DO_1$) correspondiente a cada muestra analizada. Interpolarse esta ΔA en la curva de

calibración para determinar la concentración de PCR (mg/l) correspondiente a la muestra estudiada. Las muestras con absorbancias superiores al último punto de calibración, deben ser diluidas (1: 2 o 1: 4) con solución fisiológica y procesadas nuevamente. Multiplicar el resultado obtenido por la dilución efectuada.

Interpretación de los resultados

0-5 mg/l En general, se recomienda que cada laboratorio debe establecer sus propios valores de referencia. Se aconseja efectuar dos o más determinaciones periódicas para seguir la evolución de la enfermedad.

V. Resultados

VI. Conclusiones

VII. Referencias

Burtis, C., Ashwood, E. & Bruns, D. (Eds). (2001). *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (5th ed.). Saunders Elsevier.



Dati, F. (1996). *Journal of International Federation of Clinical Chemistry*, 8(1), 29.

Ledue, T. & Rifai, N. (2003). Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clinical Chemistry*, 49(8), 1258-1271.

World Health Organization (2002). *Use Anticoagulants in diagnostic laboratory investigations*.

Young, D. S. (1995). *Effects of drugs on clinical laboratory test* (4th ed.). AACC Press.

EP5-A (Vol.19 - N.º 2) Evaluation of precision Performance of Clinical Chemistry Devices; Approved Guideline - NCCLS. - EP17-A (Vol.24 - N.º 34) Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline - NCCLS

Aislamiento de linfocitos T. y B. en donantes cadavéricos en cobayos y prueba serologica HLA clase I y clase II

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de laboratorio de inmunología especial en Aislamiento de Linfocitos B y T, a partir de órganos hematopoyéticos en animales de experimentación, en cobayos. Para realizar pruebas de histocompatibilidad serológicos de HLA Clase I y II.

II. Equipos y materiales

A. Biológico

- Cobayo (cuy).
- órganos hematopoyéticos (ganglios, bazo).

B. De laboratorio

- Equipo de disección.
- Medios de viabilidad celular.
- Cloruro de sodio al 0.9%.

- Solución LIS.
- Placas Terazaki.
- Colorante Flouruquench.
- Pipetas de jeringa Hamilton.
- Pipetas Pasteur.
- Perlas inmunomagnéticas para células linfocitos T y B.
- Magneto.
- Microscopio de campo oscuro invertido.
- Cabina de flujo laminar.
- Tubos Falco.
- jeringas de 20 cc.
- Insertos de cada reactivo para su buen uso.
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Significación clínica

El aislamiento de linfocitos se realiza con el propósito de diferenciar células de alta especificidad para desarrollar pruebas de histocom-

patibilidad serológica clase I y clase II, se utiliza perlas inmunomagnéticas.

Procedimiento

1. Extraer los órganos hematopoyéticos ganglios linfáticos y bazo
2. En un recipiente de metal agregar el órgano en un medio líquido de solución de medio de viabilidad celular para aislamiento de linfocitos.
3. Con la ayuda de una jeringa y una aguja de $21 \times 1 \frac{1}{2}$
4. Inocular a cada ganglio y al bazo el medio líquido para separar los linfocitos T y B de los mismos
5. Agregar en 2 tubos con EDTA unos 5 ml
6. Agregar 100ul de perlas inmunomagnéticas para linfocitos B y T, respectivamente.
7. Colocar al magneto por 5 minutos.
8. Con la ayuda de la pipeta pastear separar el sobrenadante, dejando las células adheridas en las paredes del tubo de ensayo.
9. Repetir por tres veces con solución del medio de viabilidad celular.
10. Al finar retirar todo el sobrenadante y agregar 11 gotas del medio en el tubo de células T, y 5 gotas del medio en el tubo de células B.
11. Suspendidas las células, cargar en la placa de Tera sakí.
12. Agregar colorante Flouruquench. A cada pozo para su tinción.

13. Llevar al microscopio para observar a las células T y B, respectivamente.
14. Anotar los hallazgos.

V. Conclusiones

VI. Referencias

- American Association of Blood Banks, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. (1997). "Células tronco" (stem cells) y progenitores hematopoyéticos. En American Association of Blood Banks, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. *Manual técnico* (12.º ed.). Edigraf.
- Boogaerts, M. A. (1999). Rational use of myeloid growth factors in Hemato-Oncology. *Acta Clin Belg*, 54(5), 312-315.
- Daley, G., Goodell, M. & Snyder E. (1993). Realistic prospects for stem cell therapeutics. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 398-418.
- Demko SG. Transplantation procedures. Burt RK, Joachim Deeg H, Lothian ST, Santos GW, eds. *Bone Marrow Transplantation*. Georgetown: Landes Bioscience; 1999, pp. 39-51.
- Jackson, K. A., Mi, T. & Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(25).

- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. & Sharkis, S. J. (2001). Multiorgan, multi-lineaje engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369.
- López, M., Andreu, G., Beaujean, F., Ehram, A., Gerota, J. & Herve P. (1985). Human bone marrow processing in view of further in vitro treatment and crypreservation. *Rev Fr Transfus Immunohemato*, 28(5), 411-426.
- Mato, E. (2004). Células madre: un nuevo concepto de medicina regenerativa. *Revista Cubana de Endocrinología*, 15(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532004000200007
- McCarthy, L. J., Danielson, C. F., Cornetta, K., Srour, E. & Broun R. (1995). Autologous Bone Marrow Transplantation. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 32, 67-119.
- McCullough, J., Clay, M., Herr, G., Smith, J. & Stroncek, D. (1999). Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors. *Transfusion*, 39(10), 1136-1140.
- Mazzara, R. & Lozano, M. (2000). Obtención de PH de sangre periférica. En E. Carreras. *Manual de Trasplante Hemopoyético* (2.ª ed., pp. 245-249). Editorial Antares
- Pamphilon, D. (2004). Stem-cell harvesting and manipulation. *Vox Sang*, 87(1), 20-25.

Guía de práctica 9

Inmunofluorescencia indirecta mediante la prueba de anticuerpos antinucleares (ANA)

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de autoinmunidad mediante la tecnología de inmunofluorescencia indirecta comprende los principios usos y aplicaciones en el diagnóstico de las enfermedades autoinmunes.

II. Equipos y materiales

Biológico

- Suero.
- Sueros conocidos con títulos altos.

De laboratorio

- Microscopio de inmunofluorescencia de campo oscuro.
- Kit de anticuerpos antinucleares.
- Solución PBS.
- Punteras.

- Pipetas automáticas graduables.
- Tubos de ensayo 12 × 75 mm.
- Cámaras húmedas.
- Copas coplin.
- Cronómetro (*timer*).
- Papel absorbente.
- Cabina de flujo laminar.
- Tubos Falco.
- Jeringas de 20 cc.
- Insertos de cada reactivo para su buen uso.
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Significación clínica

El término “anticuerpos antinucleares” describe una variedad de autoanticuerpos que reacciona con los constituyentes de los núcleos celulares incluyendo el ADN, ARN y varias proteínas y ribonucleoproteínas.

1. Estos autoanticuerpos aparecen con elevada frecuencia en pacientes con enfermedades reumáticas o del tejido conectivo, y especialmente en el caso del lupus eritematoso sistémico. De hecho, prácticamente todos los pacientes con LES son ANA positivos. Esta sensibilidad diagnóstica ha conducido a la incorporación del ensayo ANA en los Criterios Revisados para la Clasificación de Lupus Eritematoso Sistémico de 1982 realizados por una subcomisión del Colegio Americano de Reumatología.
2. Aunque los ensayos ANA son un excelente test de *screening* para el LES (un resultado negativo prácticamente permite descartar la presencia de LES3 activo), no son, de ningún modo, un ensayo específico. Los pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo, como la artritis reumatoide, el escleroderma y la dermatomiositis, dan con frecuencia resultados positivos, y también pueden observarse valoraciones de ANA bajas en otros estados patológicos y en la población normal. Pueden obtenerse resultados positivos para ANA en pacientes que han sufrido quemaduras graves o infecciones víricas y también se han dado casos en algunas personas normales sanas, especialmente en las poblaciones de mayor edad. Debido a esta ausencia de especificidad, se recomienda que todas las muestras con resultados positivos para ANA se valoren según el punto final y que se lleven a cabo ensayos más específicos para autoanticuerpos anti-ADN de doble cadena (dsDNA) y para autoanticuerpos anti-antígeno nuclear extraíble (ENA).

Procedimiento

Preparación de los portaobjetos con substrato: Espere a que el portaobjetos con substrato alcance la temperatura ambiente antes de extraerlo de su funda. Etiquételo y colóquelo en una cámara

húmeda adecuada. Añada 1 gota (20-25 L) de control positivo y negativo sin diluir en los pocillos 1 y 2, respectivamente.

1. Añada 1 gota (20-25 L) de la muestra del paciente diluida a los pocillos restantes.
2. Incubación del portaobjetos: Incube el portaobjetos durante 30 + 5 minutos en una cámara húmeda (una servilleta de papel humedecida colocada plana en el fondo de un recipiente cerrado de plástico o cristal le permitirá mantener las condiciones de humedad adecuadas). No permita que el substrato se seque durante el procedimiento de ensayo.
3. Lavado de los portaobjetos: Tras la incubación, utilice un frasco de lavado o una pipeta para lavar suavemente el suero con el tampón de PBS II diluido. Oriente el portaobjetos y el chorro del tampón PBS II de forma que le permita evitar, en la medida de lo posible, que la solución pase por encima de varios pocillos a la vez. Evite dirigir el chorro directamente sobre los pocillos para que no se dañe el substrato. Si está deseado, ponga los portaobjetos en un tarro de Coplin del almacenador intermediario diluido de PBS II por hasta 5 minutos.
4. Adición de conjugado fluorescente: Expulse el exceso de tampón PBS II. Sitúe el portaobjetos de nuevo en la cámara húmeda y cubra inmediatamente cada pocillo con una gota de conjugado fluorescente. Incube los portaobjetos durante otro 30 + 5 minutos.
5. Lavado de los portaobjetos: Repita el paso 3.
6. Cubreobjetos: Los procedimientos para los cubreobjetos varían de un laboratorio a otro. Sin embargo, recomendamos el siguiente procedimiento: a) Sitúe un cubreobjetos en una toallita de papel,

b) Aplique el medio de montaje siguiendo una línea continua en el borde inferior del cubreobjetos, c) Elimine el exceso de tampón PBS II y ponga en contacto del borde inferior del portaobjetos con el borde del cubreobjetos. Deje caer suavemente el portaobjetos sobre el cubreobjetos de forma que el medio de montaje fluya hacia el borde superior del portaobjetos sin que se formen burbujas de aire ni se queden atrapadas.

Interpretación de los resultados

Reacción negativa

Se considerará una muestra como negativa si la tinción específica es igual o inferior al control negativo para sistemas IFA. Las muestras pueden mostrar diversos grados de tinción de fondo debido a los anticuerpos heterófilos o a niveles inferiores de autoanticuerpos contra algunos constituyentes del citoplasma, como las proteínas contráctiles.

Reacción positiva

Se considerará una muestra como positiva si la tinción específica es superior al control negativo para sistemas IFA. Determine el patrón de tinción de cada muestra y pondere su intensidad de acuerdo con los siguientes criterios: 4+ Fluorescencia verde manzana brillante
3+ Fluorescencia verde manzana claro
2+ Fluorescencia positiva claramente visible
1+ La menor fluorescencia específica que permite diferenciar claramente una nuclear y/u citoplasmática estructura celular de la fluorescencia de fondo.

Anotar sus hallazgos discriminar los mismos.

V. Conclusiones

VI. Referencias

- Casals, S. P., Friou, G. J. y Myers, L. L. (1964). Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 7, 379-390.
- Gonzalez, E. y Rothfield, N. (1966) Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine*, 274, 1333-1338.
- Tan, E. M. (1982). Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunology*, 33, 167-239.
- Tan, E. M., Cohen, E. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. & Winchester, R. J. (1982). The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 25(11), 1271-127.

Guía de práctica 10
Enzimoimmunoanálisis (Elisa)

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de enzimoimmunoensayo (Elisa). HIV Método indirecto (sándwich).

II. Equipos y materiales

Biológico

- Suero.
- Sueros controles.

De laboratorio

- Analizador de Elisa.
- Kit de Elisa anti-HIV 1-2.
- Microplacas.
- Diluyente.
- Conjugado.

- Substrato.
- Solución de lavado.
- Lavador de Elisa.
- Incubadora.
- Papel absorbente.
- Cabina de flujo laminar.
- Tubos Falco.
- Pipetas automáticas.
- Insertos de cada reactivo para su buen uso.
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Significación clínica

Hasta ahora se han descrito e implicado como agentes causantes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (sida) 2 tipos de virus de la inmunodeficiencia humana, VIH-1 y VIH-2. Ambos son retrovirus que se transmiten por exposición a determinados fluidos corporales infectados, sobre todo, sangre y secreciones genitales, y por vía placentaria. La infección por VIH-1 está extendida por todo

el mundo; mientras que la infección por VIH-2 está extendida principalmente en África occidental y en algunos países europeos.

Procedimiento

Paso 1. Reconstituya y mezcle el conjugado, prepare la solución de sustrato y el líquido de lavado.

Paso 2. Utilice solo el número de pocillos que necesite para el ensayo. Evite tocar el borde y el fondo de los pocillos.

Paso 3. Añada 25 μL de diluyente de muestra a cada pocillo. 25 μL

Paso 4. Añada 100 μL de muestra o 100 μL de controles a cada pocillo. Utilice la primera columna de pocillos de cada placa para los controles del ensayo. Añada los controles en los pocillos designados después de dispensar las muestras. Pipetee 100 μL de control negativo en cada uno de los 3 pocillos, de A1 a C1, y 100 μL de los controles positivos para p24, anti-VIH-1 y anti-VIH-2 en los pocillos D1 a F1, respectivamente. Si coloca la placa sobre una superficie blanca, le será más fácil añadir la muestra. 100 μL

Paso 5. Tape los pocillos con la tapa e incúbelos durante 60 minutos a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. 60 minutos.

Paso 6. Una vez terminada la incubación, lave la placa de acuerdo con las instrucciones descritas en el apartado Procedimientos de lavado de estas instrucciones de uso.

Paso 7. Inmediatamente después de lavar la placa, añada 100 μL de conjugado en cada pocillo.

Paso 8. Tape los pocillos con la tapa e incúbelos durante 30 minutos a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. 30 minutos.

Paso 9. Una vez terminada la incubación, lave la placa de acuerdo con las instrucciones descritas en el apartado Procedimientos de lavado de estas instrucciones de uso.

Paso 10. Inmediatamente después de lavar la placa, añada 100 μL de solución de sustrato en cada pocillo. 100 μL .

Paso 11. Tape los pocillos con la tapa e incúbelos durante 30 minutos a una temperatura de $37\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$. Evítese la exposición directa a la luz solar. El color de los pocillos de las muestras reactivas se debe tornar azul verdoso. 30 minutos.

Paso 12. Añada 50 μL de solución para suspender la reacción (ácido sulfúrico entre 0,5 mol/L y 2 mol/L) en cada pocillo. 50 μL .

Paso 13. En los 15 minutos siguientes lea la absorbancia a 450 nm con una longitud de onda de referencia entre 620 nm y 690 nm si es posible. Ajuste el cero del instrumento con aire (no debe haber ninguna placa en el carril).

Interpretación de los resultados

Resultados no reactivos

Las muestras cuyos valores de absorbancia sean inferiores al valor del punto de corte se consideran no reactivas.

Resultados reactivos

Las muestras cuyos valores de absorbancia sean iguales o superiores al valor del punto de corte se consideran inicialmente reactivas

V. Conclusiones

VI. Referencias

- Clavel, F. (1987). HIV-2: The West African AIDS virus. *AIDS*, 1(3), 135-140.
- Denis, F., Leonard, G. et al. (1988). Comparison of 10 enzyme immunoassays for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *J. Clin. Microbiol*, 26(5).
- Gürtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J.M. & Kaptue, L. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol*, 68(3), 1581-5.
- Van den Haesevelde, M., Decourt, J. L., De Leys, R. J., Vanderborght, V., Groen, J., Heuverswijn, H. & Saman, E. (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol*, 68(3), 1586.

Análisis de multiplicación enzimática (EMIT)

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de ensayo de multiplicación enzimática (EMIT) para drogas inmunosupresoras; tacrolimus, ciclosporina.

II. Equipos y materiales

A. Biológico

- Sangre total.
- Células controles. Normales y patológicos.

B. De laboratorio

- Analizador de EMIT VIVA E.
- kit de dosaje de ciclosporina.
- kit de tacrolimus.
- Diluyente.
- Lisante.

- Calibradores.
- Solución de lavado.
- Metanol.
- Vortex.
- Centrífuga para biología molecular refrigerado.
- Cabina de flujo laminar.
- Tubos Eppendorf.
- Pipetas automáticas.
- Insertos de cada reactivo para su buen uso.
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Significación clínica

El tacrolimus es un agente macrólido inmunosupresor obtenido por fermentación del *Streptomyces tsukubaensis*, encontrado en el Japón. El tacrolimus ha sido estudiado en pacientes trasplantados de corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas, intestino delgado y médula ósea, siendo muy efectivo en la prevención del rechazo resistente a corticoides y ciclosporina. En este sentido, el tacrolimus es

de 10 a 100 veces más potente de la ciclosporina. Tópicamente, el tacrolimus se utiliza para el tratamiento de la dermatitis atópica del adulto y del niño.

Procedimiento

Paso 1. Prepara los reactivos 30 minutos antes del análisis retirando de la refrigeradora.

Paso 2. Utilice solo el número de tubos de Eppendorf necesarios para calibrar y controlar y las muestras a determinar.

Paso 3. Añadir los lizantes a cada uno de los tubos.

Paso 4. Completar con metanol y sustancias que establezcan la separación de la droga de los hematíes.

Paso 5. Tape los tubos y reposo por 5 minutos.

Paso 6. Llevar a mezclar al vórtex por unos segundos.

Paso 7. Inmediatamente centrifugar a 12000 g por 5 minutos.

Paso 8. Retirar los tubos Eppendorf.

Paso 9. Programar al analizador de drogas inmunosupresoras para su procedimiento analítico.

Paso 10. Esperar los resultados según sea el caso de los calibradores.

Paso 11. Realizar el mismo procedimiento para los controles bajo, normal y alto.

Paso 12. Una vez que los valores estimen buena reproducción.

Paso 13. Analizar las muestras siguiendo el protocolo.

Interpretación de los resultados

Se reporta en concentración de nanogramos por mililitro y las concentraciones tienen utilidad según la dosis del tratamiento del paciente.

V. Conclusiones

VI. Referencias bibliográficas

Fleischer, A. B. (1999). Treatment of atopic dermatitis: role of tacrolimus ointment as a topical noncorticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol*, 104(3), 126-30.

Fung, J. J., Todo, S., Demetris, A., Jain, A. Abu-Elmaged, K., Alessiani, M. & Tzakis, A. (1991). Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK 506 based immunosuppression: benefits and pitfalls. *Transplant Proc*, 23(1), 14-21.

Fung, J., Todo, S., Jain, A., McCauley, J., Alessiani, M., Scotti, C. & Starzl, C. (1999). Conversion from cyclosporine to FK 506 in liver allograft recipients with cyclosporine-related complications. *Transplant Proc*, 22(1), 6-12.

Plosker, G. L. & Foster, R. H. (2000). Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs*, 59(2), 323-89.

Diagnóstico de marcadores infecciosos de hepatitis B y C

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3-4)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de ensayo por quimioluminiscencia en el Architect 1000.

II. Equipos y materiales

A. Biológico

- Suero sanguíneo.
- Controles serológicos.

B. De laboratorio

- Analizador de quimioluminiscencia Maglumi.
- kit de dosaje de antígeno de superficie.
- kit de Anticuerpo total Core de la hepatitis B.
- kit de Anticuerpo total Core de la hepatitis C.
- Controles.
- Calibradores.

- Solución de lavado.
- Vórtex.
- Cabina de flujo laminar.
- Pipetas automáticas.
- Insertos de cada reactivo para su buen uso.
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Significación clínica

El virus de la hepatitis B (VHB) es el único patógeno en la familia de Hepadnaviridae, un virus de ADN, y se encuentra en todo el mundo. La distribución de la infección por el VHB variará entre las áreas geográficas y la población grupos. La transmisión del virus se debe a contacto parenteral, a través del intercambio de sangre o productos sanguíneos, contacto sexual.

Procedimiento

Immulite anti-HBc es una fase sólida, dos pasos Enzima quimioluminiscente Inmunoensayo. La fase sólida, unas bolas de poliestireno encerradas dentro de una prueba.

Unidad se recubre con el recombinante purificado HBcAg producido en bacterias de E. coli. La muestra del paciente se añade a la Prueba Unidad que contiene un cordón recubierto. Un alcalino Anti-HBc monoclonal marcado con fosfatasa Anticuerpo también se añade a la Unidad de Prueba. Después de los pasos de lavado e incubación, Quimio luminiscente sufre Hidrólisis en presencia de productos alcalinos Fosfatasa Immulite anti-HBc es un ensayo competitivo de anticuerpos. El fotón salida, medida por el luminómetro, está inversamente relacionado con la presencia de Anticuerpos contra HBcAg en la muestra. Ciclos de incubación: 2 × 30 minutos.

Paso 1. Prepara los reactivos 30 minutos antes del análisis retirando de la refrigeradora.

Paso 2. Utilice solo el número de tubos de reacción necesarios para calibrar y controlar y las muestras a determinar.

Paso 3. Añadir los reactivos a bordo.

Paso 4. Programar al analizador las pruebas requeridas.

Paso 5. Cargar las muestras en cada uno de los racks.

Paso 6. Verificar la posición y colocarlos a los lugares que corresponde.

Paso 7. Iniciar el analizador.

Paso 8. Monitorizar y conducir el análisis en software del equipo.

Paso 9. Esperar los resultados.

Paso 10. Analizarlos los resultados y validarlos.

Paso 11. Dar la validación e imprimirlos.

Paso 12. Reportar a las solicitudes según sea el caso.

Paso 13. Realizar los lavadores y guardar los reactivos a bordo.

Interpretación de los resultados

Interpretación se da según sean los cortes:

Reactivo. Si los valores están por encima del corte.

No reactivo. Si los valores están por debajo del corte.

“Positivo” (relación co / s de 1,15). Indica que los anticuerpos anti-HBc Detectado en la muestra, que es indicativo De HBV en curso o anterior infección.

“Negativo” (co / s ratio de <0,85). Indica que los anticuerpos anti-HBc no se han detectado en la muestra. Es posible que el individuo no está infectado con el VHB. Cualquier resultado de “Indeterminado” (co / s ratio Entre 0,85 y <1,15) debe ser Reevaluado. Las muestras que todavía prueban como “Indeterminado” debería ser probado por un método alternativo, o deben tomarse una segunda muestra si es posible dentro de un tiempo razonable (por ejemplo, una semana).

V. Conclusiones



VI. Referencias

- Hollinger, F. B., Dienstag, J. L. (1995). *Hepatitis B y D*. En: E.H. Lennette (Ed.). *Manual de la clínica microbiología* (6.ª ed., pp. 1033-1049). American Society for Microbiology.
- Locarnini S. A. y Gust, I.D. (1988). Hepadnaviridae: hepatitis B virus and delta virus. En A. Balows, W. Hausler, M. Ohashi, A. Turano & E.H. Lennete (Eds.). *Laboratory Diagnosis of infectious diseases: principles and practice*, 750-796. Springer.
- Lok Anna McMahon: AASLD. Guideline: Chronic Hepatitis B. En: www.cdc.gov/NCIDOD/DISEASES/HEPATITIS/b/aasld_update_chronichep_b.pdf.
- Teo, E. y Lok, A. (2021). Epidemiology transmission and prevention of hepatitis B virus infection. <https://hubinformacion.continental.edu.pe/recursos/up-todate/>
- Young, H. y McMillan, A. (1988). Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases. Marcel Dekker. 433-449.

Guía de práctica 13

Quimioluminiscencia para marcadores tumorales y hormonas

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de ensayo por quimioluminiscencia en el Immulite 2000XI.

II. Equipos y materiales

A. Biológico

- Suero sanguíneo.
- Controles y ajustadores.

B. De laboratorio

- Analizador de quimioluminiscencia Immulite 2000 XI.
- Kit de hormonas femeninas.
- Kit de hormonas masculinas.
- Kit de hormonas tiroideas.
- Marcadores tumorales diversos.

- Kit de ferritina, vitamina B12, ácido fólico.
- ACTH.
- Hormona de crecimiento.
- Marcadores Torch.
- Pipetas automáticas.
- Insertos de cada reactivo para su buen uso.
- Poes.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Principio analítico

El Immulite 2000, un analizador de acceso aleatorio continuo con una capacidad de procesamiento de 200 pruebas por hora, ha sido diseñado específicamente para la eficacia óptima y la consolidación a medio y laboratorios de gran volumen. El paquete de software Immulite 2000, con su interfaz de usuario gráfica explica por sí mismo, ofrece gestión de la información simplificada, de la prueba a distancia de pedido de análisis sofisticado de los resultados. Características de flujo de trabajo que mejora como el muestreo de tubo primario, las pruebas reflejo automático y de dilución a bordo se han incorporado para la velocidad y eficiencia.

Procedimiento

Immulite para todas las pruebas tiene una reacción en una fase sólida, dos paso enzima quimioluminiscente inmunoensayo. La fase sólida, una bolas de poliestireno encerradas dentro de una prueba

Unidad, se recubre con el recombinante purificado las diferentes pruebas del menú producido en bacterias de E. coli. La muestra del paciente se añade a la prueba unidad que contiene un cordón recubierto. Un alcalino del analito a investigar monoclonal marcado con fosfatasa Anticuerpo también se añade a la unidad de prueba. Después de los pasos de lavado e incubación, quimioluminiscente sufre hidrólisis en presencia de productos alcalinos fosfatasa immulite depende del analito es un ensayo competitivo de anticuerpos. El fotón salida, medida por el luminómetro, está inversamente relacionado con la presencia de anticuerpos contra el analito a investigar en la muestra. Ciclos de incubación: 2 × 30 minutos.

Paso 1. Prepara los reactivos 30 minutos antes del análisis retirando de la refrigeradora.

Paso 2. Utilice solo el número de tubos de reacción necesarios para calibrar y controlar y las muestras a determinar.

Paso 3. Añadir los reactivos a bordo.

Paso 4. Programar al analizador las pruebas requeridas.

Paso 5. Cargar las muestras en cada uno de los *racs*.

Paso 6. Verificar la posición y colocarlos a los lugares que corresponde.

Paso 7. Dar inicio al analizador.

Paso 8. Monitorizar y conducir el análisis en software del equipo.

Paso 9. Esperar los resultados.

Paso 10. Analizarlos los resultados y validarlos.

Paso 11. Dar la validación e imprimirlos.

Paso 12. Reportar a las solicitudes según sea el caso.

Paso 13. Realizar el lavador y guardar los reactivos a bordo.

Interpretación de los resultados

Según los valores de cada uno de las pruebas comparando sus valores referenciales. Se reporta la cantidad en unidades según corresponde.

V. Conclusiones

VI. Referencias

Andrews, N. C. (1995). Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 341(26),1986-1995.

Hoffman, R., Benz, Jr., Silberstein, L. E., Heslop, H., Anastasi, J. & Weitz, J. (Ed.). (2005). *Hematology: Basic Principles and Practice* (4th ed.). Churchill Livingston.

- Jacobs, A., Beamish, M. R. y Allison, M. (1972). The measurement of circulating ferritin. *Journal of Clinical Pathology*, 25(11),1003.
- Jacobs, A., Miller, F., Worwood, M., Beamish, M.R. y Wardrop, C.A. (1972). Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *British Medical Journal*, 4, 206-208.
- Olivieri, N., Brittenham, G., Matsui,D., Berkovitch, M., Blendis, L., Cameron, R., McClelland, R., Liu, P., Templeton,D. y Koren, G. (1995). Iron-Chelation Therapy with Oral Deferiprone in Patients with Thalassemia Major. *The New England Journal of Medicine*, 332, 918-922.
- Perkins G.L., Slater E.D., Sanders, G.K. y Prichard, J.G. (2003). Serum tumor markers. *Am Fam Physician*, 68(6),1075-82.
- Sánchez, D., Hallquist, P., Roesser, K. y Lin, A. (2005). The clinical use of tumor makers in select cancers: are you confident enough to discuss them with your patients? *Oncol Nurs Forum*, 32(5),1013.
- Sturgeon, C. M., Lai, L. C. y Duffy, M. J. (2009). Serum tumour markers: how to order and interpret them. *BMJ*, 339, 852-858.
- Vaidyanathan, K. & Vasudevan, D. M. (2012). Organ Specific Tumor Markers: What's New? *Indian J Clin Biochem*, 27(2), 110-120.

Guía de práctica 14
Extracción de ADN y carga viral en VIH

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla las pruebas de biología molecular mediante la extracción de DNA para realizar procedimientos de HLA de SSP y carga viral.

II. Equipos y materiales

Biológico

- Sangre total

De laboratorio

- Kit de extracción de DNA
- Kit de Proteinkinasa
- Termoblock
- Baño María a 70 °C
- Alcohol isopropílico
- Eluato

- Tubos Eppendorf
- Pipetas Eppendorf
- Vortex
- Filtros
- Analizador Gen Xpert
- Insertos de cada reactivo para su buen uso
- Poes

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Principio analítico

El ADN genómico se puede extraer a partir de todas las células con núcleo. El método más sencillo consiste en aislar el ADN a partir de suspensiones de células (sangre, *buffy coat* o células mononucleares de cultivo, células de cultivo). Existe una gran serie de protocolos para el aislamiento del ADN a partir de células. En el ensayo de PCR-SSP solo se realiza este procedimiento si se pretende obtener un ADN de calidad y cantidad suficientes para efectuar el PCR, como el método de precipitación por sal (2). Entre los proveedores de juegos comerciales de extracción de ADN recomendamos por su idoneidad por ejemplo, Puregene de la empresa Gentra Systems o Super Quick Gene™ de la empresa Analytical Genetic Testing Center.

Procedimiento

Paso 1. Prepara los reactivos 30 minutos antes del análisis retirando de la refrigeradora.

Paso 2. Utilice solo el número de tubos de reacción necesarios para extraer el material de DNA.

Paso 3. Añadir los hemolisante.

Paso 4. Centrifugar según la indicación del inserto.

Paso 5. Agregar alcohol isopropílico.

Paso 6. Repetir tres veces.

Paso 7. Añadir eluato a 70 °C.

Paso 8. Filtrar con eluato por dos veces.

Paso 9. Centrifugar.

Paso 10. El producto filtrado el material de DNA.

Paso 11. Medir al espectrofotómetro.

Paso 12. Reportar las concentraciones y pureza del ADN.

Paso 13. Anotar en la DNA teca y guardarlos hasta su uso molecular.

Paso 14. Centrifugar las muestras con EDTA y separar plasma sanguíneo a un volumen de 1cc al pack de la prueba.

Paso 15. Programar en el analizador de PCR en tiempo real para carga viral HIV.

Interpretación de los resultados

Se miden las concentraciones y se concentran o se diluyen según sea el caso. Anotar en ADN teca cada uno con sus concentraciones respectiva y se conserva a -70 °C.

Interpretar los resultados de carga viral

Según la cantidad de copias, se informa e interpreta al médico tratante en pacientes con VIH positivos para monitorizar su tratamiento.

V. Conclusiones

VI. Referencias

- Blasczyk, R., Hahn, U., Wehling, J., Huhn, D. y Salama, A. (1995). Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis. *Tissue Antigens*, 46(2), 86-95.
- Bunce, M., O'Neill, C. M., Barnado, M.C., Krausa, P., Browning, M.J., Morris, P.J. y Welsh, K.I. (1995). Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 46(5),355-367.
- Graham, D. E. (1978). The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Analytical Biochemistry*, 85(2), 609-613
- Miller, S. A., Dykes, D. D. y Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.



Olerup, O. & Zetterquist, H. (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39(5), 225-335.

Taller de manejo de equipos de alta tecnología

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolle las el manejo de equipos de alta tecnología en el servicio de inmunología.

II. Equipos y materiales

Biológico

- Especímenes biológicos diversos.

De laboratorio

- Analizador Immulite 2000 XI.
- Analizador de drogas viva E.
- Termociclador Fisher científica.
- Luminómetro Luninex 100.
- Microscopio de inmunofluorescencia de campo invertido para placas de aislamientos.

- Incubadora de cultivos celulares.
- Campana de flujo laminar.
- Architek 1000 quimioluminiscencia.
- Vortex.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Principio analítico

El Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del servicio de inmunodiagnóstico se aplica métodos inmunológicos y moleculares para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, infecciosas y la selección de receptores en trasplante de órganos.

Fundamente su trabajo en las buenas prácticas profesionales y en satisfacer los requisitos de sus clientes, legales reglamentarios e institucionales, brindando un alto nivel de confiabilidad, confidencialidad y oportunidad en los resultados emitidos. Para ello, cuenta con equipos de alta tecnología, personal calificado y comprometido en implementar las políticas y procedimientos del Laboratorio, según los requisitos de la NTC ISO-IEC 17025: 2005 para garantizar la implementación de un sistema de calidad orientado a la mejora continua de sus procesos, con el fin de obtener altos estándares de calidad técnica y de servicio.

Procedimiento

Paso 1. Presentación y manejo del analizador de Immulite 2000.

Paso 2. Presentación y manejos de equipos de inmunofluorescencia.

Paso 3. Presentaciones de equipos de biología molecular.

Paso 4. Presentación de equipos de autoinmunidad.

Paso 5. Presentación de equipos de cultivo celular y espermiograma.

Paso 6. Presentación y manejo de equipos de protección campana de flujo laminar.

Paso 7. Usos y aplicaciones de insumos y material consumible para desarrollar la tecnología.

Paso 8. Evaluación oral de los mismos.

Paso 9. Informe de fichas técnicas.

Interpretación de los resultados

Presentación d fichas técnicas de cada uno de los equipos de alta tecnología con principios y bondades en la medicina laboratorial en el diagnostico por inmunología.

V. Conclusiones



VI. Referencias

- Insertos de cada equipo o tecnología desarrollada.
- Anual de procedimientos técnicos.
- Manual operativo de los equipos presentados.

Guía de práctica 16

Control de calidad en automatización

Sección: Apellidos y nombres:

Docente: Fecha: / / 2022

Duración: 180 min. Tipo de práctica: Individual () Equipo (1-2-3)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

I. Objetivo

Desarrolla el manejo de sistemas de control de calidad estadístico en los analizadores automatizados.

II. Equipos y materiales

Sistemas estadísticos

- Registros y curvas.

De laboratorio

- Analizador Immulite 2000 XI.
- Analizador de drogas viva E.
- Luminometro Luninex 100.
- Microscopio de inmunofluorescencia de campo invertido para placas de aislamientos.
- Incubadora de cultivos celulares.
- Campana de flujo laminar.
- Architek 1000 quimioluminiscencia.

III. Notas de seguridad

Tener en cuenta las normas de bioseguridad. Además, contar con los contenedores resistentes a la punción.

IV. Procedimiento experimental

Principio de control de calidad

El Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del servicio de inmunodiagnóstico se aplica métodos inmunológicos y moleculares para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, infecciosas y la selección de receptores en trasplante de órganos.

Fundamente su trabajo en las buenas prácticas profesionales y en satisfacer los requisitos de sus clientes, legales reglamentarios e institucionales, brindando un alto nivel de confiabilidad, confidencialidad y oportunidad en los resultados emitidos. Por ello, cuenta con equipos de alta tecnología, personal calificado y comprometido en implementar las políticas y procedimientos del Laboratorio, según los requisitos de la NTC ISO-IEC 17025: 2005 para garantizar la implementación de un Sistema de Calidad orientado a la mejora continua de sus procesos, con el fin de obtener altos estándares de calidad técnica y de servicio.

Procedimiento

Paso 1. Conocer el manejo de control de calidad del analizador de Immulite 2000.

Paso 2. Revisar los sistemas de control de calidad de equipos de inmunofluorescencia.

Paso 3. Revisar el sistema de control de calidad de equipos de biología molecular.

Paso 4. Presentación de equipos de cultivo celular y espermograma.

Paso 5. Presentación y manejo de control de calidad de equipos de protección campana de flujo laminar.

Paso 6. Usos y aplicaciones de insumos y material consumible para desarrollar la tecnología.

Paso 7. Evaluación oral de los mismos.

Paso 8. Informe de fichas técnicas.

Interpretación de los resultados

Presentación d fichas técnicas de control de calidad e interpretación de las curvas estadísticas.

V. Conclusiones

VI. Referencias bibliográficas

- Insertos de cada equipo o tecnología desarrollada.
- Manual de procedimientos técnicos.
- Manual operativo de los equipos presentados.

-
- Abbas, A. K., Lichtman, A. H. y Pober, J. S. (2022). *Cellular and molecular immunology* (10th ed.). Elsevier.
- Adams, R. L. P. (1990). *Cell culture for biochemists*. Elsevier.
- Alape-Girón, A., Gustafsson, B., Lomonte, B., Thelestam, M. y Gutiérrez, J. M. (1994). Immunochemical characterization of *Micrurus nigrocinctus nigrocinctus* venom with monoclonal and polyclonal antibodies. *Toxicon*, 32(6), 695-712.
- Alape-Girón, A., Lomonte, B., Gustafsson, B., Da Silva, N. J. y Thelestam, M. (1994). Electrophoretic and immunochemical studies of *Micrurus* snake venoms. *Toxicon*, 32(6), 713- 723.
- Alape-Girón, A., Miranda-Arrieta, K., Cortés-Bratti, X., Stiles, B. G. y Gutiérrez, J. M. (1997). A comparison of in vitro methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Toxicon*, 35(4), 573-581.
- Alton, G. C. (1988). *Techniques for Brucellosis Laboratory*. INRA.
- American Association of Blood Banks, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. (1997). "Celulas Tronco" (Stem Cells) y progenitores hematopoyéticos. En American Association of Blood Banks, Asociación Argentina de Hemoterapia e Inmunología. *Manual técnico* (12.ª ed.). Edigraf.
- Andrews, N. C. (1995). Disorders of iron metabolism. *The New England Journal of Medicine*, 341(26),1986-95.

- Ariza, J. (1996). Brucellosis. *Current opinion in infectious diseases*, 9, 126-131.
- Blasczyk, R., Hahn, U., Wehling, J., Huhn, D. & Salama, A. (1995). Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis. *Tissue Antigens*, 46(2), 86-95.
- Boogaerts, M. A. (1999). Rational use of myeloid growth factors in Hemato-Oncology. *Acta Clin Belg*, 54(5), 312-315.
- Brittenham, G., Cohen, A., McLaren, C., Martin, M., Griffith, P., Nienhuis, A., Young, N., Allen, C., Farrell, D. & Harris, J. (1993). Hepatic iron stores and plasma ferritin concentration in patients with sickle cell anemia and thalassemia major. *American Journal of Hematology*, 42(1), 81-85.
- Bunce, M., O'Neill, C. M., Barnado, M.C., Krausa, P., Browning, M.J., Morris, P.J. & Welsh, K.I. (1995). Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP). *Tissue Antigens*, 46(5), 355-367.
- Burt, R. K., Deeg, H. J., Lothian, S. T., & Santos, GW. (Eds.). (1996). *Bone Marrow Transplantation*. Landes Bioscience.
- Burtis, C., Ashwood, E. & Bruns, D. (Eds.). (2001). *Tietz fundamentals of clinical chemistry* (5th ed.). Saunders Elsevier.
- Canadian Council on Animal Care. (1980). *Guide to the care and use of experimental animals* (Vol. 1). Canadian council on animal care.
- Casals, S. P., Friou, G. J. y Myers, L. L. (1964). Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and rheumatism*, 7, 379-390.

- Centers for Disease Control and Prevention. (s.f.). *Viral Hepatitis*. Recuperado el 14 de enero de 2022, de http://www.cdc.gov/NCI-DOD/DISEASES/HEPATITIS/b/aasld_update_chronichep_b.pdf
- Clavel, F. (1987). HIV-2: The West African AIDS virus. *AIDS*, 1(3), 135-140.
- Clinical and Laboratory Standards Institute. (2004). *Protocols for determination of limits of detection and limits of quantitation: Approved Guideline*, 24(34).
- Consejo Ejecutivo (1958). *Comité Mixto FAO/OMS de Expertos en brucelosis: Tercer informe*. Organización Mundial de la Salud. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/105730>
- Daley, G., Goodell, M. & Snyder E. (1993). *Realistic prospects for stem cell therapeutics*. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*, 398-418.
- Dati, F. (1996). *Journal of International Federation of Clinical Chemistry*, 8(1), 29.
- Dati, F. (2001). The existing interim consensus reference ranges and the future approach. *Clinical Chemistry and laboratory medicine*, 39(11), 1134-1136.
- Denis, F., Leonard, G. et al. (1988). Comparison of 10 enzyme immunoassays for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *J. Clin. Microbiol*, 26(5).
- Dresser, D.W. (1986). Immunization of experimental animals. En D. Weir, L. Herzenberg, C. Blackwell & L. Herzenberg. *Handbook of Experimental Immunology* (p. 8, Vol. 1). Blackwell.

- Engvall, E. (1980). Enzyme immunoassay: ELISA and EMIT. *Methods Enzymol*, 70(A), 419-439.
- Fahey, J.L. y McKelvey, E.M. (1965). Quantitative determination of serum immunoglobulins in antibody-agar plates. *J. Immuno*, 94, 84-90.
- Fleischer, A. B. (1999). Treatment of atopic dermatitis: role of tacrolimus ointment as a topical noncorticosteroid therapy. *J Allergy Clin Immunol*, 104(3), 126-30.
- Freshney, R. I. (1992). *Animal cell culture: A practical approach* (2nd ed.). IRL Press.
- Fung, J. J., Todo, S., Demetris, A., Jain, A. Abu-Elmaged, K., Alessiani, M. & Tzakis, A. (1991). Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK 506 based immunosuppression: benefits and pitfalls. *Transplant Proc*, 23(1), 14-21.
- Fung, J., Todo, S., Jain, A., McCauley, J., Alessiani, M., Scotti, C. & Starzl, C. (1999). Conversion from cyclosporine to FK 506 in liver allograft recipients with cyclosporine-related complications. *Transplant Proc*, 22(1), 6-12.
- Goding, J. W. (1986). *Monoclonal antibodies: principles and practice*, Academic Press.
- Gonzalez, E. y Rothfield, N. (1966) Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine*, 274, 1333-1338.
- Graham, D. E. (1978). The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Analytical Biochemistry*, 85(2), 609-613.

- Gürtler, L.G., Hauser, P.H., Eberle, J., Knapp, S., Zekeng, L., Tsague, J.M. & Kaptue, L. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol*, 68(3), 1581-5.
- Hoffman, R., Benz, Jr., Silberstein, L. E., Heslop, H., Anastasi, J. & Weitz, J. (Ed.). (2005). *Hematology: Basic principles and practice* (4th ed.). Churchill Livingston.
- Hollinger, F. B., Dienstag, J. L. (1995). *Hepatitis B Y D*. En: E.H. Lennette (Ed.). *Manual de la clínica microbiología* (6.^a ed., pp. 1033-1049). American Society for Microbiology.
- Jackson, K. A., Mi, T. & Goodell, M. A. (1999). Hematopoietic potential of stem cells isolated from murine skeletal muscle. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96(25).
- Jacobs, A., Beamish, M. R. & Allison, M. (1972). The measurement of circulating ferritin. *Journal of Clinical Pathology*, 25(11),1003.
- Jacobs, A., Miller, F., Worwood, M., Beamish, M.R. & Wardrop, C.A. (1972). Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. *British Medical Journal*, 4, 206-208.
- Kindt, T. J., Goldsby, R. A., & Osborne, B.A. (2007). *Inmunología de Kuby* (6th ed.). McGraw-Hill.
- Krause, D. S., Theise, N. D., Collector, M. I., Henegariu, O., Hwang, S., Gardner, R., Neutzel, S. & Sharkis, S. J. (2001). Multiorgan, multi-lineaje engraftment by a single bone marrow-derived stem cell. *Cell*, 105(3), 369.
- Ledue, T. & Rifai, N. (2003). Preanalytic and analytic sources of variations in C-reactive protein measurement: implications for cardiovascular disease risk assessment. *Clinical Chemistry*, 49(8), 1258-1271.

- Locarnini S. A. & Gust, I. D. (1988). Hepadnaviridae: hepatitis B virus and delta virus. En A. Balows, W. Hausler, M. Ohashi, A. Turano & E.H. Lennete (Eds.). *Laboratory diagnosis of infectious diseases: Principles and practice*, 750-796. Springer.
- López, M., Andreu, G., Beaujean, F., Ehram, A., Gerota, J. & Herve P. (1985). Human bone marrow processing in view of further in vitro treatment and cryppreservation. *Rev Fr Transfus Immunohemato*, 28(5), 411-426.
- Mato, E. (2004). Células madre: un nuevo concepto de medicina regenerativa. *Revista Cubana de Endocrinología*, 15(2). http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1561-29532004000200007
- Mazzara, R. & Lozano, M. (2000). Obtención de PH de sangre periférica. En E. Carreras. *Manual de Trasplante Hemopoyético* (2.ª ed., pp. 245-249). Editorial Antares.
- McCarthy, L. J., Danielson, C. F., Cornetta, K., Srour, E. & Broun R. (1995). Autologous bone marrow transplantation. *Crit Rev Clin Lab Sci*, 32, 67-119.
- McCullough, J., Clay, M., Herr, G., Smith, J. & Stroncek, D. (1999). Effects of granulocyte-colony-stimulating factor on potential normal granulocyte donors. *Transfusion*, 39(10), 1136-1140.
- Miller, S. A., Dykes, D. D., & Polesky, H. F. (1988). A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Research*, 16(3), 1215.
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. (1999). Evaluation of precision performance of clinical chemistry devices: *Approved Guideline*, 19(2).
- Office of the Federal Register National and Records Administration. (1992). Code of Federal Regulations. Title 9, Animals and animal products. Government Printing Office.
- Olerup, O. & Zetterquist, H. (1992). HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An

alternative to serological DR typing in clinical practice including donor-recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens*, 39(5), 225-335.

Olivieri, N., Brittenham, G., Matsui, D., Berkovitch, M., Blendis, L., Cameron, R., McClelland, R., Liu, P., Templeton, D., & Koren, G. (1995). Iron-Chelation therapy with oral deferiprone in patients with thalassemia major. *The New England Journal of Medicine*, 332, 918-922.

Otsuji, S., Shibata, H. & Umeda, M. (1982). Turbidimetric immunoassay of serum C-reactive protein. *Clinical Chemistry*, 28(10), 2121-2124.

Pamphilon, D. (2004). Stem-cell harvesting and manipulation. *Vox Sang*, 87(1), 20-25.

Perkins G.L., Slater E.D., Sanders, G.K. & Prichard, J.G. (2003). Serum tumor markers. *Am Fam Physician*, 68(6), 1075-82.

Plosker, G. L. & Foster, R. H. (2000). Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. *Drugs*, 59(2), 323-89.

Sanchez, D., Hallquist, P., Roesser, K. & Lin, A. (2005). The clinical use of tumor makers in select cancers: are you confident enough to discuss them with your patients? *Oncol Nurs Forum*, 32(5), 1013.

Schaumburg, I. (1995). In *veterinary technology: AVMA, Membership directory and resource manual* (44th ed.). AVMA.

Simon, F., Mauclère, P., Roques, P., Loussert-Ajaka, I., Müller-Trutwin, M.C., Saragosti, S., Georges-Courbot, M.C., Barré-Sinoussi, F. & Brun-Vézinet, F. (1998). Identification of a new human

immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med*, 4(9), 1032-1039.

Smith, A. (1988). *Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio: El ratón* (3.º ed.). Centro Panamericano de Fiebre Aftosa y OMS.

Sturgeon, C. M., Lai, L. C. & Duffy, M. J. (2009). Serum tumour markers: how to order and interpret them. *BMJ*, 339, 852-858.

Tan, E. M. (1982). Autoantibodies to nuclear antigens (ANA): their immunobiology and medicine. *Adv Immunology*, 33, 167-239.

Tan, E. M., Cohen, E. S., Fries, J. F., Masi, A. T., McShane, D. J., Rothfield, N. F., Schaller, J. G., Talal, N. & Winchester, R. J. (1982). The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism*, 25(11), 1271-127.

Teo, E. & Lok, A. (2021). Epidemiology transmission and prevention of hepatitis B virus infection. <https://hubinformacion.continental.edu.pe/recursos/up-todate/>

Tizard, I. R. (2004). *Veterinary immunology, an introduction* (6th ed.). Elsevier.

Tur-Mari, J. A. & Orellana-Muriana, J. M. (Eds.). (2000). *Animal research and welfare: a partnership. FELASA-ICLAS Joint Meetitn, 7th symposium*, Palma de Mallorca 26-28 May 1999. Laboratory animals.

Vaidyanathan, K. & Vasudevan, D. M. (2012). Organ specific tumor markers: what's new? *Indian J Clin Biochem*, 27(2), 110-120.

Van den Haesevelde, M., Decourt, J. L., De Leys, R. J., Vanderborght, V., Groen, J., Heuverswijn, H. & Saman, E. (1994). Genomic cloning

and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol*, 68(3), 1586.

World Health Organization (2002). *Use anticoagulants in diagnostic laboratory investigations*. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/65957>

Young, D. S. (1995). *Effects of drugs on clinical laboratory test* (4th ed.). AACC Press.

Young, D. S. (2000). *Effects of drugs on clinical laboratory test* (5th ed.). AACC Press.

Young, E. J. (1995). An overview of human brucellosis. *Clinical Infectious Diseases*, 21(2), 283-290.

Young, H. & McMillan, A. (1988). *Immunological diagnosis of sexually transmitted diseases*. Marcel Dekker.

