



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE ANÁLISIS INSTRUMENTAL

II SEMESTRE

Benito Cano Acevedo

QF U de C, Esp en Bioquímica Clínica

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Bacteriología





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

Rector

Miguel Ángel Henríquez López

Vicerrector General

Miguel Henríquez Emiliani

Vicerrectora Académica

Patricia De Moya Carazo

Vicerrector Administrativo y Financiero

Nicolás Arrázola Merlano

Directora Institucional de la Calidad

Rosario López Guerrero

Directora de Investigación

Judith Herrera Hernández

Directora programa de Bacteriología

Rosana de la Torre Barboza

**Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-
Cartagena**

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Elayne Flórez Julio

Eliana Buelvas Pereira

Revisión y corrección de estilo

Zarina Durango Herazo

Autor

Benito Cano Acevedo



TABLA DE CONTENIDO	PAG
PRESENTACION	6
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO.	7
PLAN DE TRABAJO	9
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES	10
PRACTICA N°1. INSTRUMENTOS ÓPTICOS	11
PRACTICA N°2.ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN	13
PRACTICA N°3.ABSORBANCIA VS LONGITUD DE ONDA.	15
PRACTICA N°4. CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA SERICAS POR FOTOMETRIA VISIBLE	18
PRACTICA N°5. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMATICA FOTOMETRIA ULTRAVIOLETA	21
PRACTICA N°6.DETERMINACIÓN TURBIDIMÉTRICA DE PROTEÍNAS EN ORINA	24
PRACTICA N°7. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS POR ENZIMOINMUNOANALISIS (E.I.A)	28
PRACTICA N°8. CUANTIFICACIÓN DE ELECTROLITOS POR POTENCIOMETRÍA.	31
PRACTICA N°9. CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS POR ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.	34
PRACTICA N° 10. ANÁLISIS Y PROGRAMACIÓN DE TÉCNICAS PUNTO FINAL, CINÉTICAS	37

PRESENTACIÓN

El desarrollo de la ciencia y la tecnología van de la mano con el diseño y producción de nuevos instrumentos, así como la tecnología de punta que cada día producen mejores resultados para el análisis clínico, toxicológico e industrial de diferentes tipos de muestras. La información obtenida hoy en día de la composición de la materia ha sido posible gracias a la aplicación de un número creciente de métodos analíticos fundamentados en propiedades fisicoquímicas de la materia con gran precisión, exactitud y sensibilidad.

Los profesionales de Bacteriología, en el quehacer de su vida laboral, ya sea en el área clínica o industrial, suministran información valiosa cualitativa o cuantitativa del análisis de muestras biológicas o no biológicas, de manera que se hace imperativo para ellos adquirir desde el principio de su carrera fundamentos teóricos –prácticos de los diferentes métodos analíticos instrumentales, sus aplicaciones en los diferentes campos de la química analítica para resolver problemas relacionados con la composición de la materia. Lo anterior le permitirá realizar opciones inteligentes dentro de las muchas formas posibles que tiene para resolver un problema y, por último, conocer las limitaciones de estos métodos en términos de sensibilidad, precisión y exactitud.

Análisis Instrumental se convierte entonces en esa asignatura que le brinda a los futuros Bacteriólogos las bases teóricas y las habilidades prácticas para un manejo racional y eficiente de los diferentes instrumentos puestos a su disposición, en el camino de la ardua labor de identificar y determinar las proporciones de un analito que permitan tomar dediciones en el campo del diagnóstico clínico, toxicológico e industrial.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- Utilizar siempre los elementos de barrera de protección apropiados según las necesidades: bata, gorro, guantes, tapabocas y gafas etc. Nunca circular con ropa de calle y/o cambiarse de ropa dentro del Laboratorio.
- Siempre respetar las señalizaciones de Bioseguridad.
- Reportar siempre a su docente los accidentes ocurridos en el Laboratorio.
- Lávese las manos vigorosamente antes y después de efectuar un procedimiento.
- Los elementos corto punzantes como agujas, lancetas y otros, deben ser desechados con precauciones para evitar lesiones (utilice siempre el guardián).
- Si padece lesiones exudativas o dermatitis debe evitar el contacto con los pacientes y con los equipos de trabajo, hasta que estas sanen.
- Utilice siempre dispositivos de pipeteo mecánico en el manejo de líquidos y reactivos, nunca bucal.
- Absténgase de comer, beber o fumar en el laboratorio.
- Es responsabilidad de cada estudiante el manejo del reactivo al que tenga acceso, conozca todos los símbolos de riesgo para el manejo de las sustancias.
- En caso de derrames neutralice, desinfecte y luego limpie el derrame con un material absorbente.
- Nunca debe esterilizar material limpio con contaminado.
- Utilizar adecuadamente los equipos y proporcionarles un mantenimiento conveniente y permanente, si un equipo se contamina con una muestra biológica, deberá ser descontaminado con hipoclorito de sodio al 7% y luego limpiarlo de acuerdo con las especificaciones del fabricante.
- En caso de rompimiento de un tubo o derrame en la centrifuga apáguela inmediatamente y espere treinta minutos antes de abrirla para evitar la formación de aerosoles.
- Al inicio y al final de una práctica de laboratorio o después de salpicaduras con



sangre u otros líquidos corporales, las superficies de las mesas deberán ser decontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.

- Todo material contaminado deberá ser eliminado en bolsa roja.



PLAN DE TRABAJO

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



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

1. Lápiz de Cera o marcador cristalográfico.
2. Colores
3. Guantes desechables.
4. Mascarilla o tapabocas.
5. Gafas de protección.
6. Toalla pequeña
7. Muestra solicitada.
8. Papel absorbente
9. Guías de laboratorio previamente estudiadas.
10. Folder. Tema y # de la práctica a desarrollar, objetivos, materiales, procedimiento, resultados (Dibujos), conclusión personal y desarrollo de talleres.
11. lápiz, borrador, sacapuntas, calculadora.

PRÁCTICA N° 1 INSTRUMENTOS ÓPTICOS

I. INTRODUCCIÓN

Los instrumentos son dispositivos de medidas inventados por el hombre para obtener información cuantitativa de la composición de la materia, en un sentido más amplio, constituyen el puente entre el método y el operador para interpretar un fenómeno químico, físico o físico-químico (denominado señal analítica) que guarda estrecha relación con la proporción del componente de interés a cuantificar (Concentración).

Los primeros instrumentos espectroscópicos fueron diseñados para la región visible y, en consecuencia, recibieron la denominación de instrumentos ópticos, actualmente, se ha extendido el significado de este término de modo de incluir los instrumentos diseñados para trabajar en las regiones ultra violeta y, visible del espectro electromagnético.

Como se ha dicho anteriormente, los métodos espectroscópicos se fundamentan en la interacción entre materia y energía, donde pueden ocurrir los fenómenos de Absorción, Emisión o Dispersión de Energía. De acuerdo a lo anterior es lógico pensar que existirán diferencias en el diseño de los instrumentos dependiendo del tipo de señal analítica que utilicen. En un sentido muy general se pueden señalar cinco componentes básicos de los instrumentos ópticos independientes de si se utilizan en la región visible.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Afianzar mediante la práctica las bases teóricas de los instrumentos ópticos que permitan una mejor comprensión del funcionamiento y las diferentes aplicaciones de estos dispositivos en el análisis instrumental.



OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar los componentes básicos de los instrumentos ópticos.
- Conocer las funciones de cada componente en el instrumento.
- Conocer los diferentes materiales y diseños de elaboración de los componentes básicos de los instrumentos ópticos dependiendo de la región del espectro utilizada.
- Diseñar un instrumento óptico.

III. PROCEDIMIENTO

Previa lectura de la guía se conforma grupos de cinco estudiantes y apoyado en un instrumento (Fotómetro) el docente identifica cada uno de partes básicas del mismo resaltando la función de cada una, posteriormente se procede a representar mediante un esquema y guiados por un orden lógico un instrumentos óptico.

IV. TALLER

1. De acuerdo a lo realizado en la práctica diseñe un instrumento óptico.
2. ¿Qué fuentes de energía se utilizan en la región visible, ultra violeta?
3. ¿Qué diferencias existen entre los filtros y los monocromadores?
4. ¿Qué tipos de detectores se utilizan región visible, ultra violeta?
5. ¿Qué materiales se utilizan para construir las celdas en la región visible, ultra violeta?

PRÁCTICA N°2 ABSORBANCIA VS CONCENTRACIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La ley de Beer establece la relación entre la Absorbancia y la Concentración de la especie absorbente, en la práctica cuando se trabaja en la región visible del espectro electromagnético, lo que se mide es la absorción de energía por un cromógeno, entendiéndose por esto una sustancia capaz de desarrollar un color en solución. Por esta razón estos métodos también se le denominan métodos “**Colorimétricas**”, es decir medida de color, se asume entonces que la intensidad del color formado es directamente proporcional a la absorción de energía y, esta a su vez, está en relación directa con la concentración de la especie absorbente (Cromógeno),

II.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Comprender mediante la práctica el efecto de la concentración sobre la absorción de energía en el análisis fotométrico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Demostrar la relación que existe entre Absorbancia y Concentración
- Demostrar la relación que existe entre la Absorbancia y la intensidad del color

III.REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Reactivo de Biuret
- Solución estándar de proteínas
- Agua destilada



- Cincos Beaker pequeños
- Diez tubos de ensayos
- Pipetas automáticas

IV. PROCEDIMIENTO

- Preparar cinco soluciones de diferentes concentraciones a partir de la solución estándar de proteínas (8000mg/dl) aplicando la ecuación $V_1C_1 = V_2C_2$.
Concentraciones 20 mg/dl, 40 mg/dl, 60 mg/dl, 80 mg/dl, 100 mg/dl.
 - Rotular cinco tubos de ensayos, con las diferentes concentraciones a efectuar.
 - Pipetear en cada tubo 2000 ul del reactivo de Biuret.
 - Pipetear la solución estándar según la concentración deseada.
 - Incubar 10 minutos a temperatura ambiente.
 - Leer la transmitancia de cada solución a 578 nm de longitud de onda.
 - Convertir a absorbancia.
- 4.1. Construir tabla de A, T, C.

V. TALLER

1. Realizar una gráfica de concentración y absorbancia con los resultados obtenidos.
2. Investigar la desviación química e instrumental a la ley de Beer.
3. Investigar el concepto de Blanco Reactivo.
4. ¿Cómo se aplica la ley de Beer para soluciones concentradas?

PRÁCTICA N°3 ABSORBANCIA VS LONGITUD DE ONDA.

I. INTRODUCCIÓN

La región visible del espectro electro magnético está comprendida entre 400 – 700 nm, siempre que se va a realizar un análisis fotométrico es necesario especificar a qué longitud de onda de la región visible se va a hacer la lectura. De lo anterior surge las preguntas: ¿Cómo seleccionar la longitud de onda correcta? ¿Por qué se debe hacer la lectura a una determinada longitud de onda?, Estas son preguntas que deben resolverse antes de iniciar un análisis fotométrico. Por lo general, se escoge como longitud de onda de trabajo aquella en la cual la especie absorbente muestra la mayor absorción de energía, a este valor se le conoce como longitud de onda máxima, y hace referencia al valor en la cual se establece la mejor interacción entre materia y energía, de manera que el valor de absorbancia obtenido es el mejor estimativo del valor de la concentración esperada.

II.OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Mediante la práctica demostrar la importancia de seleccionar la longitud de onda adecuada para la realización de análisis fotométricos, de manera que permita obtener la mejor relación entre absorción de energía y concentración de la especie absorbente.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el valor de longitud máxima para una especie absorbente dada.
- Analizar la importancia de seleccionar la longitud de onda máxima en el análisis fotométrico

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Solución reactiva de Ácido Pícrico.
- Solución reactiva Biuret.
- Solución reactiva verde de malaquita.
- Solución reactiva fucsina.
- Tubos de Ensayos.
- Pipetas Automáticas.
- Gradillas.

IV. PROCEDIMIENTO

- Dejar atemperar los reactivos a la temperatura ambiente.
- Ajustar el instrumento a 100% de transmitancia o 0.00 de Absorbancia con agua destilada.
- Colocar las soluciones de color en la celda de trabajo en la celda de trabajo.
- Determinar el valor de Absorbancia a 400, 450, 500, 550, 600,650 y 700 nm de longitud de onda de cada una de las soluciones en el fotómetro.
- Tabular los resultados obtenidos (longitud de onda, transmitancia, absorbancia).
- Graficar Absorbancia vs longitud de onda.
- Determinar el valor de la longitud de onda máxima de cada una de las soluciones reactivas.

V. TALLER

1. ¿Qué conclusiones puedes deducir de la práctica?
2. Explicar cuáles son las consecuencias de no seleccionar correctamente la longitud de onda adecuada en un análisis fotométrico.
3. Investigar para soluciones de color azul, verde y rojo cuáles son los valores de



longitud de onda apropiados.

4.Cuál es el significado del concepto nanómetro?

5. Establezca una relación entre color, absorbancia y longitud de onda.

PRÁCTICA N°4 CUANTIFICACIÓN DE GLUCOSA SÉRICAS POR FOTOMETRÍA VISIBLE

I. INTRODUCCIÓN

Las medidas fotométricas representan la fase final de la mayoría de las determinaciones cuantitativas que se efectúan en química analítica. Hay numerosas razones que justifican esta preponderancia de la fotometría; las más importantes de ellas son la rapidez y facilidad de las medidas, su adecuada especificidad y sensibilidad, la existencia en el mercado de instrumentos que, con precio relativamente bajo, dan una exactitud y precisión adecuada y, por último, la facilidad con que las determinaciones fotométricas se adaptan a la automatización.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Afianzar mediante la práctica los conceptos teóricos de la fotometría visible discutidos en clase como método analítico útil en la cuantificación de muchas sustancias químicas en el laboratorio clínico e industrial.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

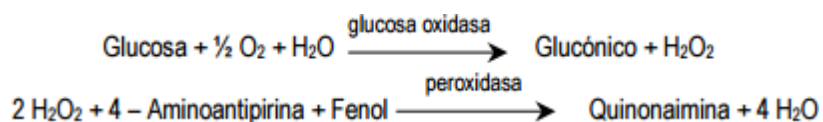
- Determinar la absorbancia de la solución estándar.
- Determinar la absorbancia de la muestra problema.
- Aplicar la ley de Beer para el cálculo de la concentración de glucosa de la muestra.

III. MÉTODO

- Colorimétrico de Punto final.

IV. FUNDAMENTO

La glucosa presente en la muestra original, según las reacciones acopladas descritas a continuación, un complejo coloreado que se cuantifica por espectrofotometría.



V. REACTIVOS Y MATERIALES

- Reactivo de Glucosa.
- Estándar de Glucosa.
- Tubos de ensayos.
- Pipetas automáticas de 1000 ul, 10 ul.
- Gradillas.
- Papel absorbente.

VI. MUESTRA

- Suero humano obtenido por venopunción normal y centrifugación de la sangre.

VII. PROCEDIMIENTO

- Atemperar los reactivos a la temperatura de trabajo.
- Rotule tres (3) tubos de ensayos como estándar, muestra y blanco para cada prueba.
- Pipetear 1000 ul de solución reactiva en cada tubo de ensayo.
- Adicione 10 ul de estándar, muestra (suero humano), en su respectivo tubo.
- Incubar 10 min. a temperatura ambiente.
- Leer la absorbancia del estándar, muestra y blanco a 500 +-20 nm.
- Calcular la concentración de glucosa de la muestra.



VIII. TALLER

1. ¿Qué otras sustancias se pueden cuantificar por fotometría visible? ¿Qué función cumple el blanco reactivo en el análisis?
2. ¿Qué se entiende por métodos colorimétricos de punto final?
3. ¿Cuál es la utilidad clínica de la cuantificación de glucosa?

PRÁCTICA Nº 5 CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA FOTOMETRÍA ULTRAVIOLETA

I. INTRODUCCIÓN

La fotometría ultra violeta es un método analítico que se fundamenta en la absorción de energía en la región del espectro electromagnético comprendido entre los 300 a 380 nm de longitud de onda, a diferencia de la región visible, este tipo de energía no es perceptible por el ojo humano. La fotometría ultra violeta es de vital importancia para el laboratorio clínico en la cuantificación de la actividad enzimática, lo cual a su vez, es de gran utilidad para los profesionales de la salud, ya que contribuye de forma significativa a la prevención, diagnóstico y tratamiento de muchas enfermedades.

Es posible seguir el curso de una **reacción enzimática** en la región ultra violeta midiendo la velocidad de formación o desaparición de las coenzimas NAD^+/NADH , $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$. Las coenzimas que participan en las **reacciones de óxido-reducción**, pueden sufrir cambios de estado en el curso de la reacción, es decir, pueden pasar del estado oxidado al estado reducido o en sentido contrario.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Afianzar las bases teóricas de la fotometría ultra violeta estudiadas en clase y visualizar su campo de aplicación en el área clínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar actividad enzimática en suero humano.
- Calcular los cambios de absorbancia por minuto de la reacción enzimática.
- Graficar la absorbancia en función del tiempo.
- Determinar el tipo de reacción según los cambios de absorbancia.

III.MÉTODO

- Cinético delta con factor.

IV. FUNDAMENTO

La actividad enzimática está en relación directa con la velocidad de formación o desaparición de los cofactores enzimáticos reducidos, dependiendo de si la reacción es creciente o decreciente. Los cambios de absorbancia se miden en la región ultravioleta a 340 nm, los cuales al ser multiplicado por un factor proporciona la actividad enzimática de la muestra.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Kit de reactivos comerciales para cuantificar la actividad enzimática.
- Tubos de ensayo.
- Gradillas.
- Pipetas automáticas.
- Cronómetros.
- Baño serológico.
- Centrífuga.
- Fotómetro.

VI. MUESTRA

- Suero humano obtenido por venopunción normal y centrifugación de la sangre.

VII. PROCEDIMIENTO

- Pipetear la solución reactiva y muestra según protocolo establecido por la casa comercial (Bayer, Human, Biosystem).



- Incubar dos minutos a 37°C en un baño serológico.
- Leer la absorbancia a 1, 2 y 3 minutos.
- Calcular el cambio de absorbancia por minuto y multiplicarlo por el factor de cálculo, según la casa comercial para expresar la actividad enzimática en UI/L o Kat/L

VIII. TALLER

1. Investiga los conceptos de enzima, cofactores enzimáticos, actividad enzimática.
2. Realiza una gráfica de absorbancia Vs tiempo.
3. ¿Qué otras sustancias pueden ser cuantificadas en el laboratorio clínico por fotometría ultra violeta?
4. Elabora una matriz de comparación y contraste entre la fotometría visible y ultra violeta.

PRÁCTICA N° 6 DETERMINACIÓN TURBIDIMÉTRICA DE PROTEÍNAS EN ORINA

I. INTRODUCCIÓN

Por su versatilidad, sencillez y aplicación los métodos turbidimétricos son de gran aplicación en el laboratorio clínico en la cuantificación de un gran número de sustancias. La turbidimetría relaciona el grado de turbidez de precipitados insolubles con la concentración de la sustancia. Es importante controlar variables como el tamaño de las partículas, las proporciones de los reactivos, la reproducibilidad de las suspensiones, a fin de obtener los mejores resultados analíticos.

Las pruebas clásicas para detectar proteínas en la orina implican la precipitación de las mismas químicamente o por calentamiento. El precipitado incluye todos los tipos de proteínas con una sensibilidad de 1 a 10 mg/dl, siendo la cantidad de precipitado bastante proporcional a la cantidad de proteínas existentes en la muestra.

Una excreción proteica en orina de 24 horas superior a 150 mg/dl al día, casi siempre es significativa. La proteína más frecuente es la albúmina. La albuminuria indica, frecuentemente, una permeabilidad glomerular anormal debida a enfermedad glomerular intrínseca o a modificaciones en la presión sanguínea, como hipertensión y anomalías de las venas sanguíneas.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Afianzar los conceptos teóricos de las técnicas turbidimétricas como procedimientos analíticos útiles en la cuantificación de biomoléculas y metabolitos en el laboratorio.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Cuantificar proteínas en orina utilizando mediante turbidimetría.
- Analizar las variables que afectan a la turbidimetría.
- Visualizar la aplicación práctica de la turbidimetría en análisis cuantitativo.

III.MÉTODO

- Punto final-Multiestándar (Curva de Calibración) con blanco reactivo.

IV. FUNDAMENTO

Las proteínas son precipitadas por el ácido sulfosalicílico, y el grado de turbidez es directamente proporcional a la concentración de proteínas de la muestra.

V. REACTIVOS , MATERIALES Y EQUIPOS

- Ácido sulfosalicílico al 3 %
- Solución salina al 0.9%
- Estándar de proteínas de 8000 mg/dl.
- Tubos de ensayo.
- Pipetas automáticas.
- Pipetas graduadas de 5 y 10 cc
- Gradillas.
- Fotómetro.

VI. MUESTRA

- Orina de 24 horas.



VII. PROCEDIMIENTO

- Partiendo de la solución estándar de 8000 mg/dl, prepara una serie de estándares de concentraciones: 20,40, 60, 80, 160 y 320 mg/dl, para construir una curva de calibración.
- Utilizando tubos de ensayo limpios pipetear según el siguiente esquema.

	ESTANDARES	MUESTRA	BLANCO
Ácido sulfosalicílico	2000 ul	2000 ul	2000ul
Diluciones	500 ul		
Muestra		500 ul	
Agua destilada			500 ul

- Mezclar e incubar a temperatura ambiente por cinco minutos.
- Leer la absorbancia de la muestra y calibradores a 340 nm de longitud de onda.
- Construir una curva de calibración graficando Absorbancia vs. Concentración de los calibradores utilizados en el ensayo, sobre papel milimetrado. Representar la absorbancia muestra en el eje de las absorbancias y determinar la concentración muestra en el eje de las concentraciones.

VIII. TALLER.

1. Elabora una matriz de comparación y contraste entre la turbidimetría y la fotometría ultra violeta.
2. ¿Qué es la Nefelometría y en qué se diferencia de la turbidimetría?
3. ¿Qué cuidados debemos tener al trabajar con técnicas turbidimétricas?

4. Investiga la utilidad clínica de cuantificación de proteínas en orina
5. Se remite al laboratorio clínico una muestra de orina de 24 horas para cuantificar el contenido de proteínas, el volumen total de orina es de 2.700 ml, el bacteriólogo mediante un análisis cualitativo observa que el contenido de proteínas es alto, por lo cual decide hacer una dilución tomando una alícuota de orina y diluyendo con 950 ul de S.S. hasta un volumen final de 1000 ul, se procesa la dilución junto con cinco calibradores de proteínas utilizando el procedimiento turbidimétrico del ácido sulfosalicílico a 340 nm de longitud de onda lo cual arrojó los siguientes resultados para los calibradores:

C (mg %)	A
10	0.025
20	0.55
40	0.80
80	1.50
160	2.70

- Si la absorbancia muestra, $A_m = 0.75$, construir una curva de calibración y calcular el contenido de proteínas en la orina de 24 horas.

PRÁCTICA N°7 CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS POR ENZIMOINMUNOANÁLISIS (E.I.A)

I. INTRODUCCIÓN

Las hormonas o mensajeros químicos como también se les llama son las principales responsables de regular el metabolismo del organismo, son las responsables de la activación e inactivación de las diferentes enzimas encargadas de realizar las diferentes vías metabólicas.

Los desórdenes hormonales ocasionan un gran número de procesos patológicos que incluso pueden ocasionar la muerte de la persona sino se corrige a tiempo. Cuantificar hormonas es una tarea importante que realiza el bacteriólogo en el laboratorio clínico, como ayuda diagnóstica y tratamiento de las diferentes patologías ocasionadas por trastornos hormonales. El Enzimoinmunoanálisis es un tipo de Inmunoanálisis con marcador ampliamente utilizado en los laboratorios clínicos para cuantificar hormonas.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Afianzar mediante la práctica las bases teóricas de los métodos inmunoanalíticos discutidos en clases como herramienta analíticas que proporcionan información cualitativa y cuantitativa de la composición de la materia de gran utilidad en el laboratorio clínico

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar cada componente de un sistema enzimoinmunoanalítico.
- Conocer cada una de las funciones de los reactivos en un Enzimoinmunoanálisis.
- Cuantificar hormonas por Enzimoinmunoanálisis.

- Visualizar la importancia clínica de los métodos inmunoanalíticos.

III. MÉTODO

- Enzimo Inmunoanálisis no competitivo o tipo sándwich, Multiestándar.

IV. FUNDAMENTO

Los antígenos (sustancia a cuantificar) presente en la muestra reacciona con anticuerpos inmovilizados dirigidos contra el antígeno y anticuerpos marcados con la enzima peroxidasa, formando una especie de sándwich, la actividad de la enzima mide fotométricamente a 420 nm de longitud de onda y es directamente proporcional a la concentración del antígeno.

V. REACTIVO, MATERIALES Y EQUIPOS

- **Calibradores:** químicamente son soluciones de concentraciones conocidas del analito de interés a cuantificar, utilizados para construir la curva de calibración y calcular la concertación de la muestra problema.
- **Micro vasos (Microwell):** contienen en su interior anticuerpo inmovilizados dirigidos contra la sustancia de interés a analizar, en ellos se realiza toda la marcha analítica, además, cumplen la función de celda para que sé de la interacción entre materia y energía, constituye la fase sólida del Inmunoanálisis.
- **Un anticuerpo o un antígeno marcado con una enzima:** cuya función es hacer evidente la reacción antígeno-anticuerpo, cuantificando actividad enzimática en la región ultra violeta o visible.
- **Una solución sustrato:** Necesaria para que la enzima pueda expresar su actividad catalítica ya sea en la región visible o ultra violeta.



- **Solución de parada:** generalmente es una solución de ácidos minerales diluidos utilizada para detener la actividad enzimática en un momento dado y poder realizar las lecturas de absorbancia o concentración.
- **Papel semilogaritmico:** utilizado para construir la curva de calibración graficando absorbancia contra concentración en un plano de ejes coordinados(X,Y)
 - Gradillas para micropozos.
 - Pipetas de 5 – 50 ul.
 - Papel absorbente.
 - Frasco lavador.
 - Cronometro.
 - Lector de micro Elisa.

V. PROCEDIMIENTO

Las casas comerciales que producen y distribuyen reactivos para Inmunoanálisis establecen sus protocolos analíticos teniendo en cuenta todas las variables que pueden afectar estas técnicas como temperatura, pH, sustratos, tiempos de incubación, ciclos de lavados, etc. El analista debe leer cuidadosamente las instrucciones y recomendaciones antes de proceder a ejecutar el Inmunoanálisis.

VI. TALLER

1. Representa un Inmunoanálisis competitivo y no competitivo
2. ¿Qué son anticuerpos monoclonales y policlonales?
3. ¿Qué enzimas se utilizan como marcadores?
4. ¿Qué son Inmunoanálisis heterogéneos y homogéneos?
5. ¿Qué radioisótopos se utilizan como marcadores?

6. ¿Qué ventajas representa utilizar anticuerpos monoclonales en Inmunoanálisis?
7. ¿Qué significa el concepto Microelisa?
8. ¿Cuáles son las características de la reacción antígeno-anticuerpo?
9. Realiza un mapa conceptual utilizando las bases teóricas de Inmunoanálisis.

PRÁCTICA Nº 8 CUANTIFICACIÓN DE ELECTRÓLITOS POR POTENCIOMETRÍA.

I. INTRODUCCIÓN

La Potenciometría es una técnica electroquímica, utilizada para determinar la concentración de una especie electro activa en una disolución, método analítico electroquímico basado en la medida de la diferencia de potencial entre electrodos sumergidos en una solución, siendo el potencial de uno de los electrodos función de la concentración de determinados iones presentes en la solución. La medida de los potenciales de electrodo permite obtener de forma directa la concentración de una sustancia o seguir su evolución a lo largo de una reacción química.

Una valoración Potenciometría es una valoración basada en la medida del potencial de un electrodo indicador adecuado en función del volumen de un “valorante”.

La Potenciometría es una técnica de análisis que ha sido aplicada en diferentes áreas de análisis, se caracteriza por ser un método más preciso y exacto que el utilizado en valoraciones donde intervienen soluciones indicadoras ya que, por la variabilidad al identificar ciertos “colores” o la naturaleza de la muestra, pudieran obtenerse resultados con más desviación, o bien, algún resultado fuera del real.

Los electrodos que se utilizan para realizar esta técnica han sido desarrollados para mejorar su aplicación y hacer de éste, un método de análisis más preciso, selectivo y que proporcione datos exactos.

Considerado un método fácil, rápido, versátil y, muy económico y una técnica sencilla de realizar.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Afianzar mediante la práctica los conceptos teóricos de la Potenciometria como procedimiento analítico útil en la cuantificación de un gran número de sustancias químicas de gran valor diagnostico en el laboratorio clínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar cada componente del instrumento a utilizar.
- Determinación cuantitativa de iones: potasio (K), sodio (Na), cloruro (Cl), calcio(Ca) y pH ionizados, en suero.

III. MÉTODO

Potenciometria.

IV. FUNDAMENTO

Los analizadores de electrólito HumaLyte Plus 3 son instrumentos analíticos automáticos, controlados por microprocesadores, que emplean la tecnología ISE (electrodo selectivo de iones) para efectuar mediciones destinadas a diagnósticos in vitro sobre los niveles de potasio (K), sodio (Na), cloruro (Cl), calcio (Ca) y pH ionizados, en el suero, el plasma y la sangre total.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Solución QC de 100ml.
- Acondicionador de Na de 100ml.
- Solución limpieza de 100 ml.



- Gradillas.
- Tubos de ensayo.
- Papel absorbente.
- HumaLyte Plus³.

VI. MUESTRA

- Suero, plasma y/o sangre total.

VII. TALLER.

- ¿Indique las aplicaciones del método de Potenciometría?
- ¿Qué sustancias pueden ser medidas por Potenciometría en el laboratorio?
- ¿Diseña un instrumento potenciómetro?
- ¿Cuál es la utilidad clínica de la cuantificación de los iones determinados en la práctica?

PRÁCTICA Nº 9 CUANTIFICACIÓN DE INMUNOGLOBULINAS POR ANÁLISIS DE INMUNOPRECIPITACIÓN.

I. INTRODUCCIÓN

Este tipo de Inmunoanálisis se fundamentan en la reacción antígeno – anticuerpo secundaria, la evidencia de la reacción es la formación de un inmunoprecipitado que puede indicar la presencia o ausencia de un antígeno o un anticuerpo, también se aprovecha la formación del precipitado para cuantificar sustancias por diversos procedimientos analíticos. La sensibilidad de estos Inmunoanálisis es inferior a los de tipo de reacción primaria y, en general, se utilizan para cuantificar sustancias del orden de los miligramos obteniéndose resultados fiables y exactos en la cuantificación de inmunoglobulinas y proteínas del complemento, etc.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

- Afianzar mediante la práctica los conceptos teóricos del Inmunoanálisis de precipitación como procedimientos analíticos útiles en la identificación y cuantificación de un gran número de sustancias químicas de gran valor diagnóstico en el laboratorio clínico.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Visualizar la formación de un inmunoprecipitado por una reacción antígeno-anticuerpo.
- Relacionar la formación del precipitado con la concentración de sustancia problema.
- Cuantificar inmunoglobulinas por turbidimetría.

III.MÉTODO

- Turbidimétrico, Multiestándar con blanco reactivo.

IV.FUNDAMENTO

El antígeno y el anticuerpo soluble son invisibles en un medio líquido cuando reaccionan entre sí, las moléculas del complejo antígeno-anticuerpo se entrelazan formando un complejo tridimensional insoluble y visible, estos precipitados dan lugar a una turbidez que está en estrecha relación con la concentración de la muestra. La turbidez se mide fotométricamente a una longitud de onda de 340 nm. Con las absorbancias obtenidas en el análisis de una serie de calibradores se construye una curva de calibración, de la cual se deriva la concentración de la muestra.

V.REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Anticuerpos anti Inmunoglobulinas (A; G; M; E; D) de cabra.
- Calibradores.
 - Gradillas para tubos de ensayos.
 - Tubos de ensayos.
 - Pipetas de 5 – 50 ul
 - Pipetas de 200 – 1000 ul
 - Cronómetros.
 - Fotómetro.

VI. MUESTRA

- Suero o plasma.



VII. PROCEDIMIENTO

- Las casas comerciales productoras de reactivos para el laboratorio clínico incorporan sus protocolos analíticos en el kit de reactivos, el analista antes de proceder a realizar el análisis debe leerlo detenidamente
- Construir una curva de calibración graficando Absorbancia vs. Concentración de los calibradores utilizados en el ensayo sobre papel milimetrado o semilogaritmico, representar la absorbancia muestra en el eje de las absorbancias y calcular la concentración muestra en el eje de las concentraciones.

VIII. TALLER.

1. ¿Cuál es la utilidad clínica de la cuantificación de inmunoglobulinas?
2. ¿Cómo afecta la proporción de los reactantes los análisis de inmunoprecipitación?
3. ¿Qué se entiende por inmunodifusión radial (IDR)?
4. Realiza una matriz de comparación y contraste entre Enzimoanálisis y análisis de inmunoprecipitación.

PRÁCTICA N° 10. ANÁLISIS Y PROGRAMACIÓN DE TÉCNICAS: PUNTO FINAL, CINÉTICAS.

I.

INTRODUCCIÓN

El análisis e interpretación crítica de los procedimientos de medida es un paso fundamental para una programación adecuada de los instrumentos ópticos a fin de obtener mejores resultados en cuanto a rapidez, precisión, sensibilidad y exactitud de los resultados al tiempo que se facilita en gran medida el trabajo de laboratorio.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL.

- Analizar y programar las técnicas analíticas en química Clínica que permitan una correcta programación de los instrumentos semiautomáticos.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Interpretar cada una de los componentes de una técnica analítica.
- Explicar los fundamentos analíticos que permiten la cuantificación de sustancias.

III. PROCEDIMIENTO

En este apartado el estudiante debe leer, comprender y analizar los fundamentos y aspectos técnicos a programar dependiendo del procedimiento de medida seleccionado por el docente. Es importante que el estudiante realice una lectura autorregulada del inserto haciendo énfasis en cada uno de los componentes que hacen parte del mismo.



IV. TALLER

1. A partir de la lectura autorregulada del inserto, diseñe una representación gráfica creativa y personal donde demuestre su comprensión sobre el fundamento teórico.
2. Interprete el esquema de pipeteo señalado en el inserto anexo, mediante la elaboración de un diagrama de flujo del procedimiento que usted llevaría a cabo para la cuantificación del analito seleccionado.
3. Mediante un ejemplo hipotético ilustre las consecuencias de no programar correctamente las técnicas analíticas.



BIBLIOGRAFÍA.

- 1- Skoog-Huller-Nieman. Principios de Análisis Instrumental. Editorial Pearson Hall. Novena Edición. 2007. Kenneth A Rubinson. Judith F Rubinson. Análisis Instrumental. Editorial Pearson Hall, 2008.
- 2- Day and Underwood. Química Analítica. Editorial Prentice Hall. Quinta edición. 2008.
- 3- D.A. SKOOG D. M. WEST. Análisis Instrumental. McGraw Hill. 2000
- 4- GEORGE H. SCHENK; Richard B., HAHN, Arleigh; V. Hartkope. Química Analítica Cuantitativa. Compañía Editorial Continental, S.A DEC C.V. México 2000.
- 5- R.J. Henry D.C.; Cannon J.W. Winkelman. Química Clínica. Bases y Técnicas. JLMS.



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

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

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

www.curn.edu.co

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

