



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ
PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

**GUÍA DE LABORATORIO
DE GENÉTICA
II SEMESTRE
Doris Olier Castillo**

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

Raúl Padrón Villafañe

Autor

Doris Olier Castillo



TABLA DE CONTENIDO

PRESENTACIÓN	4
NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO	5
PLAN DE TRABAJO	6
MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES.....	7
PRÁCTICA No. 1 CONCEPTUALIZACIÓN.....	8
PRÁCTICA No. 2 VENOPUNCIÓN	10
PRÁCTICA No. 3 Y No. 4 EXTRACCIÓN DE ADN	15
PRÁCTICA No. 5 CARIOTIPO	19
PRÁCTICA No. 6 CARIOGRAMA	21
PRÁCTICA No. 7 TEST DE DINITROFENILHIDRAZINA Y TEST DE CLORURO FÉRRICO	23
PRÁCTICA No. 8 TEST DE NITROPRUSIATO Y TEST DE NITROSONAFTOL .	29
PRÁCTICA No. 9 TEST DE IÓN CÚPRICO, TEST DE RESORCINOL Y TEST DE GLUCOSA OXIDASA.....	34
BIBLIOGRAFÍA	39



PRESENTACIÓN

La genética ha avanzado en los últimos años de forma vertiginosa, esto la hace indispensable hoy por hoy en el ámbito del apoyo diagnóstico para muchas enfermedades, sean infecciosas o no infecciosas.

Colombia no ha sido ajena a este panorama y es muy frecuente el uso de la genética tradicional o genética molecular, no sólo en las pruebas de filiación sino también en el diagnóstico de enfermedades hereditarias o de compromiso genético, en especial de las multifactoriales como el cáncer. Es por ello que el profesional de la bacteriología debe tener conocimientos básicos de laboratorio de genética, tanto para pruebas tradicionales como para pruebas moleculares.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, la presente guía se constituye en un recurso educativo para afianzar los conceptos y pruebas de genética humana para el diagnóstico de enfermedades aprendidas en la teoría de la asignatura de Genética del Programa de Bacteriología de la Corporación Universitaria Rafael Núñez.

En esta guía de laboratorio se trabajan cuatro grandes aspectos: principios de la genética humana, fundamentos moleculares de la herencia, cromosomas, y genética y bioquímica; lo que serán útiles para los estudiantes en el desarrollo de las 32 horas de clases prácticas durante el período académico.



NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO

Para esta clase y todas las demás clases prácticas, los estudiantes de la Corporación Universitaria Rafael Núñez deben acatar las normas de bioseguridad del Centro Experimental de Investigación y Docencia (CEID). Dentro de estas, se debe tener en cuenta principalmente lo siguiente:

- Utilizar las medidas de bioseguridad básicas en el vestir: bata, gorro (cabello recogido totalmente dentro de este), tapabocas, zapatos cerrados y guantes durante toda la clase.
- Trabajar concentradamente y sin descuidos para evitar accidentes.
- Estar atento a la información de los reactivos, para tener la debida precaución cuando se trabaje con reactivos ácidos, álcalis, irritantes, tóxicos o mutagénicos.
- Sentarse separadamente en los mesones, es decir: evitar el “hacinamiento” por mesón de trabajo. Así se evitan accidentes al desplazarse con material potencialmente peligroso.
- Colocar las pipetas con las puntas mirando al fondo del mesón y las tapas de los reactivos hacia arriba.
- Realizar correctamente los desechos de los desechos anatomopatológicos, sucios, no peligrosos, peligrosos, cortopunzantes.
- Tener abierta la llave del agua cuando se descarta material en la poceta.
- Cabello recogido totalmente dentro del gorro.
- Al finalizar, lavarse las manos, dejar todo el material recogido y el laboratorio organizado.



PLAN DE TRABAJO

- Antes de cada clase, el estudiante debe haber leído en esta guía lo que corresponde, con el fin de comprender los conceptos abordados y profundizar en los mismos.
- Tenga en cuenta que en esta guía cada clase está identificada con el nombre de **PRÁCTICA** y en cada una hay un subtítulo denominado RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA que indica el tipo de material que debe llevar cada estudiante para el buen desarrollo de la clase.
- Esta guía debe ser llevada impresa a cada clase.
- Antes de entrar al laboratorio, cada alumno debe colocarse sus elementos de bioseguridad. Al entrar asegurarse de que los mesones están limpios y secos.
- El trabajo se realizará individual o por pequeños grupos a discreción del docente. El material de trabajo será distribuido por el docente.
- Marque adecuadamente el material necesario.
- Cualquier pregunta, realícela al docente.
- Al terminar, descartando el material en la forma correspondiente al tipo de material o desecho.



MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES

El material necesario para cada clase, será llevado al laboratorio por el personal del CEID y distribuido por el docente.

Adicionalmente, puede haber un material de responsabilidad del estudiante que se encuentra especificado por cada práctica como se explica en la página anterior.



PRÁCTICA No. 1: CONCEPTUALIZACIÓN

I. INTRODUCCIÓN

Se puede decir que la genética humana es una parte de la genética que se caracteriza por el estudio sólo de los genes del ser humano y todo lo concerniente a estos como su estructura, composición, función, cambios y segregación. Así mismo abarca todas las enfermedades de origen genético o hereditario.

Además, es importante conocer todo acerca de los ácidos nucleicos que contienen y transmiten el material genético, así como los procesos celulares y moleculares necesarios para la buena dinámica de la expresión génica y de la herencia.

En consecuencia, es necesario para el buen desarrollo del curso comprender y asimilar diversos conceptos básicos para ello.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Asimilar el significado de conceptos básicos de la genética humana aplicados a este curso de laboratorio de genética.

Objetivos específicos

- Comprender que es la genética humana.
- Analizar diferentes conceptos.
- Asimilar el uso de los conceptos.



RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno, para realizar su clase en el laboratorio, debe ingresar con bata de laboratorio, gorro y zapatos cerrados.

III. PROCEDIMIENTO

En esta primera clase, se realizará una introducción al laboratorio de genética que consistirá en socializar este documento y en analizar en el aula, a manera de conversatorio, los siguientes conceptos básicos que tienen como fin establecer conocimientos a priori:

- Célula eucariota (citoplasma, núcleo).
- Célula anucleada. ¿Tenemos los seres humanos?
- Sangre: tejido líquido, células sanguíneas.
- Ácidos nucleicos: ARN y ADN.
- Utilidad del ADN en diferentes ámbitos.
- Gen.
- Mutaciones.
- Cromosomas.
- Alteraciones cromosómicas.
- Enfermedades de origen genético.
- Enfermedades hereditarias.



PRÁCTICA No. 2: VENOPUNCIÓN

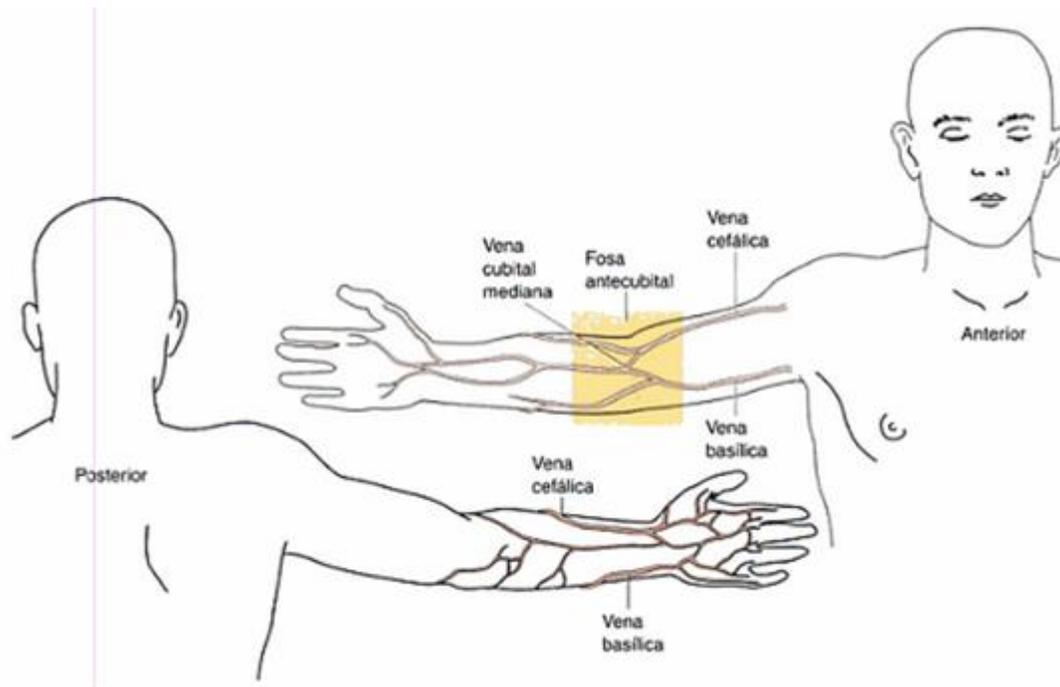
I. INTRODUCCIÓN

La venopunción es el proceso de recolección de sangre a partir de una vena. La sangre se deposita en un tubo seco o en un tubo con anticoagulante, el cual puede variar dependiendo de la prueba a realizar. Siempre se debe tener precaución en este proceso y todas las muestras deben tratarse como infecciosa para patógenos transmitidos por la sangre (hepatitis C, B, D, sífilis, paludismo, VIH).

La mayoría de las veces, la sangre se extrae de una vena localizada en la parte interior del codo o el dorso de la mano. Las venas superficiales de la cara anterior del antebrazo son las más comunes para la venopunción.

Las tres venas principales que se utilizan son:

1. vena cefálica: ubicada en la parte superior del antebrazo y del lado del pulgar de la mano.
2. vena basílica: ubicada en la parte inferior del antebrazo y del lado del dedo meñique de la mano.
3. vena cubital mediana: que conecta las venas basílica y cefálica en la fosa antecubital (flexión del codo) y es la vena de elección.



Fuente: <http://venopuncion.blogspot.com.co/>

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Extraer sangre venosa.

Objetivos específicos

- Practicar el proceso de venopunción.
- Adquirir destreza en toma de muestra sanguínea.

RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno, para realizar su clase en el laboratorio, debe ingresar con bata de laboratorio, gorro, máscara (tapabocas) y zapatos cerrados. Además, debe llevar guantes, otros elementos de bioseguridad, así como elementos para marcar su material (cinta de enmascarar o marcador).



- Cada estudiante debe traer, para la toma de muestra sanguínea, dos jeringuillas de 5 cm estériles, un torniquete y dos curitas pequeñas redondas.

III. FUNDAMENTO

A partir de una vena de grueso calibre extraer con una aguja estándar, sangre periférica.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Tubos de ensayo con heparina.

Gradillas.

Tubos Falcon de 15 cc.

Pipeta automática de 1000 μ l con sus puntas.

Recipientes para descartar material sucio.

Recipientes para descartar residuos anatomopatológicos.

Centrífuga de 3000 rpm.

V. MUESTRA

Sangre total.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Tener listo en el mesón: jeringuilla probada, algodón con alcohol, algodón seco, torniquete, tubo marcado con nombre y apellidos del paciente.
2. Explíquelo a su paciente (compañero) el procedimiento que le va a realizar.
3. Colóquese los guantes.
4. Colocar el brazo hiperextendido, de manera que la mano esté más baja que el codo.



5. Palpe las venas de su paciente. Elegir vena de grueso calibre.
6. Una vez escogida la vena, verifique que el paciente esté cómodamente sentado.
7. Coloque el torniquete entre 5 y 10 cm por encima del lugar escogido para la punción. Si el paciente aprieta el puño, después de colocado el torniquete, la vena se torna más prominente.
8. Palpe suavemente la vena con la yema del dedo índice de la mano que más usa, para determinar la profundidad, dirección y el diámetro de la vena.
9. Si no puede identificar lo anterior, retire el torniquete y vuelva a comenzar.
10. Para desinfectar el punto de punción, con el algodón que tiene alcohol ejecute movimientos circulares de adentro hacia afuera. Deje secar al aire libre.
11. Inmovilice la vena seleccionada colocando el pulgar debajo de la zona de punción y tense la piel,
12. Efectúe la punción introduciendo la aguja con el bisel hacia arriba en la piel y luego en la vena en dirección contraria al flujo sanguíneo. Mantenga un ángulo de 15 a 25 grados. Una vez se haya visualizado la sangre en el extremo distal de la aguja, hale lentamente el émbolo y tome los cuatro centímetros cúbicos (4 cc) de sangre que necesita. Una vez alcance la muestra necesaria, retire el torniquete, coloque el algodón seco encima de la aguja, retire la aguja y presione inmediatamente el sitio de punción con el algodón.
13. Solicítele al paciente que mantenga presión en el área por varios segundos (puede decirle que doble el brazo).
14. Introduzca la aguja en su protector, teniendo este sobre el mesón (nunca en la mano).
15. Separe la aguja de la jeringuilla.
16. Deposite lentamente la muestra de sangre en el tubo con anticoagulante (la sangre debe rodar por la pared del tubo). **Tape el tubo y mezcle suavemente por inversión.**
17. Coloque la venda o curita al paciente.
18. Ponga la jeringuilla dentro de su empaque plástico original.
19. Deposite la aguja en el guardián. Todo lo demás en la caneca roja.



Una vez obtenida la sangre, esta se centrifugará para separar el componente líquido del celular. La capa de células blancas (buffy coat) se transferirá a un tubo Falcon debidamente marcado; este se almacenará a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la próxima clase.



PRÁCTICA No. 3 Y No. 4: EXTRACCIÓN DE ADN

I. INTRODUCCIÓN

La molécula de DNA ha sido objeto de infinidad de estudios debido a que contiene todo la información génica de un organismo. Es por eso que desde el inicio de la genética molecular se han ideado, desarrollado y estandarizado métodos y técnicas para extraer, separar y/o aislar este ácido nucleico con el fin de realizar estudios posteriores que permitan conocer la funcionalidad de los genes y determinar a través de ello anomalías que nos conduzcan a un mayor entendimiento de la herencia humana y las patologías de origen genético.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Extraer ADN a partir de los leucocitos de cada quien.

Objetivos específicos

- Comprender el estudio del ADN y su utilidad.
- Adquirir destrezas en el montaje y manejo de las pruebas realizadas.

RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno para realizar su clase en el laboratorio debe ingresar con bata de laboratorio, gorro, máscara (tapabocas) y zapatos cerrados. Además, debe llevar guantes, otros elementos de bioseguridad, así como elementos para marcar su material (cinta de enmascarar o marcador).



III. MÉTODO

Método de Salting Out modificado.

IV. FUNDAMENTO

A partir de sangre total, se lisan los glóbulos rojos (células anucleadas) dejando libres los glóbulos blancos, a los que se les adiciona, en condiciones apropiadas, enzima proteolítica con el fin de destruir sus membranas y proteínas cromosómicas, dejando libre el DNA.

V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Buffer de lisis de células rojas.

Agua destilada estéril.

Buffer proteinasa K.

Proteinasa K.

Sodio duodecil sulfato 20% (SDS grado electroforesis-ultrapuro).

NaCl 6M.

Etanol al 99,5% **FRÍO**.

Gradillas.

Pipeta automática de 1000 μ l con sus puntas.

Pipeta automática de 100 μ l con sus puntas.

Pipetas Pasteur plásticas.

Toallas de papel.

Tubos de centrifuga plásticos tapa azul graduados (tubos Falcon de 15 cc).

Recipientes para descartar.

Centrífuga de 3000 rpm.

Baño a 55 °C.

Vórtex.



VI. MUESTRA

Capa de glóbulos blancos (buffy coat).

VII. PROCEDIMIENTO

1. Sacar el buffy coat del congelador. Permitir descongelación de forma natural y dejar atemperar el tubo.
2. Adicionar 1 ml de buffer de lisis de células rojas.
3. Mezclar por inversión suavemente por 30 segundos.
4. Centrifugar 10 minutos a 3.000 rpm.
5. Descartar el sobrenadante.
6. Adicionar 1 ml de agua destilada estéril y mezclar por inversión.
7. Centrifugar 5 minutos a 3.000 rpm.
8. Descartar el sobrenadante y secar el exceso de fluido.
9. Resuspender el botón en:
 - 80 μ l de buffer proteinasa K 5X.
 - 1.5 μ l de proteinasa K (200 μ g/ μ L).
 - 20 μ l de SDS 20%.
 - 268.5 μ l de agua destilada (para un volumen final con el botón de 400 μ l).
10. Incubar con agitación suave durante 30 minutos a 55 °C.

Dejar atemperar los tubos y guardarlos a -20 °C hasta la próxima clase.

Permitir que los tubos se descongelen y alcancen la temperatura ambiente por si solos. Continuar el procedimiento así:



11. Mezclar suavemente para homogenizar el contenido.
12. Adicionar 100 μ l de NaCl 6 M.
13. Agitar vigorosamente (manualmente o con vórtex) por 15 segundos.
14. Centrifugar 15 minutos a 3.000 rpm.
15. Recoger el sobrenadante en otro tubo por decantación o pipeteándolo.
16. Centrifugar 6 minutos a 3.000 rpm.
17. Recoger el sobrenadante en otro tubo.
18. Adicionar 1 ml de etanol 99,5% frío.
19. Mezclar suavemente por inversión y observar el DNA.



PRÁCTICA No. 5: CARIOTIPO

I. INTRODUCCIÓN

La palabra cromosoma se deriva del griego *chroma* (color) y *soma* (cuerpo). Su comportamiento durante la división de las células somáticas en la mitosis asegura que cada célula hija mantenga su propia dotación genética completa. De modo similar, el comportamiento de los cromosomas durante la meiosis para la formación de gametos proporciona a cada uno de ellos, óvulo y espermatozoide, la dotación haploide. Los cromosomas son los vehículos que transportan el DNA y, consiguientemente, facilitan la reproducción y perpetuación de la especie.

Por lo tanto, es esencial el estudio de los cromosomas para determinar la presencia o ausencia de anomalías génicas o cromosómicas con fines diagnósticos antes del nacimiento o durante algún período de la vida de los seres humanos, o por fines investigativos.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Comprender los principios de la genética humana y los mecanismos para analizar la herencia de determinados factores desde diversos tipos de estudios.

Objetivos específicos

- Comprender el estudio de los cromosomas y su utilidad.
- Analizar diferentes técnicas utilizadas.



RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno para realizar su clase en el laboratorio debe ingresar con bata de laboratorio, gorro y zapatos cerrados.

III. PROCEDIMIENTO

En esta clase se desarrollarán teóricamente aspectos de los cromosomas como estructura, clasificación, número, cromosomas autosómicos y sexuales. Así mismo, se analizará lo que es la citogenética, el cariotipo, los distintos tipos de este y el cariograma.



PRÁCTICA No. 6: CARIOGRAMA

I. INTRODUCCIÓN

El cariograma es la imagen cromosómica completa del individuo descrito en términos de número, forma, tamaño y distribución en el núcleo. Se obtiene fotografiando la preparación conseguida en el cariotipo sencillo o en el bandeado cromosómico y seleccionando cada uno de los cromosomas de la fotografía para clasificarlos en pares de mayor a menor tamaño teniendo en cuenta la posición del centrómero y situando los brazos cortos hacia arriba.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Comprender los principios de la genética humana y los mecanismos para analizar la herencia de determinados factores desde diversos tipos de estudios.

Objetivos específicos

- Comprender el estudio de los cromosomas y su utilidad.
- Analizar diferentes técnicas utilizadas.
- Adquirir destrezas en el cariograma.

RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno para realizar su clase en el laboratorio debe ingresar con bata de laboratorio, gorro, máscara (tapabocas) y zapatos cerrados.
- Cada estudiante debe entrar a la clase con unas tijeras y una goma o pegante.



III. FUNDAMENTO

Para visualizar el resultado del cariotipo, se van recortando los cromosomas y ubicando en la planilla donde están ya marcados los grupos de cromosomas según los criterios de clasificación de Denver, que agrupa los autosomas en siete grupos denominados con las letras mayúsculas de la A a la G, según su longitud decreciente, y al final se representan los cromosomas sexuales.

IV. REACTIVOS, MATERIALES, EQUIPOS

Planilla de cariograma según escala de Denver.

V. MUESTRA

Foto de metafases.

VI. PROCEDIMIENTO

1. Estudiar detenidamente la foto de la metafase y colocar a cada cromosoma con un lápiz el número del par al que pertenece.
2. Recortar cada pareja de cromosomas e ir agrupándolos de acuerdo con su forma, tamaño y bandas de tinción (si es un bandeo).
3. En la planilla del cariograma, pegar cada pareja de cromosomas en su sitio específico, teniendo en cuenta que en el punto que aparece en la planilla deben ir ubicados los centrómeros.
4. Reportar.



PRÁCTICA No. 7: TEST DE DINITROFENILHIDRAZINA Y TEST DE CLORURO FÉRRICO

I. INTRODUCCIÓN

Como las proteínas (producto final del gen) son en su mayoría enzimas, y estas intervienen en las diferentes rutas metabólicas, muchas alteraciones genéticas o procesos hereditarios son causados por defectos en la actividad de las enzimas. Las enzimas son catalizadores biológicos que llevan a cabo determinadas clases de reacciones químicas y actúan transformando sustratos moleculares en productos por medio de reacciones bioquímicas. Las reacciones enzimáticas no se producen al azar ni aisladamente, por eso, en una vía metabólica, el producto de una reacción sirve de sustrato para la reacción siguiente de esa vía.

Como las reacciones bioquímicas están organizadas como vías, una mutación génica que cause pérdida de la actividad de una sola enzima puede tener efectos sobre el fenotipo de diversas maneras. Primero, el hecho de acumularse uno o más precursores en esa vía puede ser perjudicial. Los precursores acumulados también pueden provocar la sobreutilización y sobrecarga de otras vías metabólicas de menor importancia, dando lugar a la aparición y acumulación de productos metabólicos tóxicos. Segundo, la ausencia de un producto metabólico puede ser nociva, o la reacción bloqueada puede impedir que se produzca la reacción siguiente en la vía que permite la síntesis de un determinado producto. De todas maneras, se debe tener presente que no todos los bloqueos metabólicos inducen necesariamente un fenotipo anormal. En algunos casos, la mutación produce una variación fenotípicamente neutra que se distribuye ampliamente en la población. Esas variaciones son conocidas como polimorfismos. Los errores enzimáticos del metabolismo producen por tanto, gran número de efectos fenotípicos, que van desde los que carecen de consecuencias hasta los que producen la muerte antes



del nacimiento o en los comienzos de la lactancia. Estos errores son conocidos como Errores Congénitos del Metabolismo o Errores Innatos del Metabolismo (EIM).

Por lo tanto, los EIM ocurren como consecuencia de trastornos genéticos poco comunes en los cuales el cuerpo es incapaz de metabolizar de manera normal los componentes de los alimentos. Generalmente son causados por defectos en las enzimas implicadas en las vías bioquímicas que descomponen los componentes de los alimentos convirtiéndolos en energía o calor para ser utilizados o absorbidos por el cuerpo.

Estos EIM pueden ser entonces en la vía de los aminoácidos (a.a), los cuales son los constituyentes de las proteínas. El ser humano puede sintetizar parte de los 20 a.a que constituyen las proteínas.

Los aminoácidos están clasificados en “esenciales” y “no esenciales”. Los aminoácidos que no pueden ser sintetizados por el organismo y que deben ser consumidos en la dieta diaria se conocen como aminoácidos esenciales. En el hombre hay 10 aminoácidos esenciales y son: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptófano, valina y alanina. Los aminoácidos no esenciales son los producidos por el organismo a partir de los esenciales: arginina, ácido aspártico, asparagina, cisteína, ácido glutámico, glutamina, glicina, prolina, serina y tirosina.

Para determinar si un individuo padece un EIM e la vía de los aminoácidos se realiza un tamizaje metabólico de aminoácidos, el cual es un conjunto de pruebas que busca determinar si la persona tiene un error metabólico en esta vía. La batería de pruebas está conformada principalmente por las pruebas de Dinitrofenilhidrazina, cloruro férrico, Nitroprusiato y Nitrosoaftol.



II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Aplicar diferentes técnicas para detectar errores en el metabolismo de los aminoácidos.
- Correlacionar los resultados de las técnicas ejecutadas con diagnósticos de enfermedades hereditarias metabólicas.

Objetivos específicos

- Adquirir destreza en el procedimiento de técnicas de tamizaje metabólico en el laboratorio.
- Desarrollar habilidades en la interpretación de resultados de estas pruebas.
- Correlacionar el resultado de las pruebas con posibles diagnósticos para el tratamiento y pronóstico de un caso individual, en errores de las diferentes vías metabólicas.

RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno para realizar su clase en el laboratorio debe ingresar con bata de laboratorio, gorro, máscara (tapabocas) y zapatos cerrados. Además debe llevar guantes, otros elementos de bioseguridad, así como elementos para marcar su material (cinta de enmascarar o marcador).
- Cada estudiante debe entrar a clases con una muestra de orina en un recipiente recolector de orina con mínimo 10 ml. La recolección de la muestra la puede realizar en la corporación antes de entrar a clases.



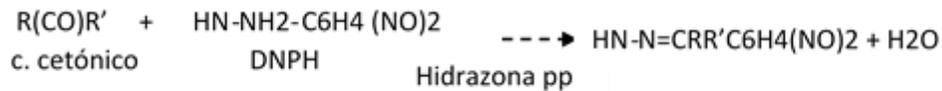
III. MÉTODO

Colorimetría.

IV. FUNDAMENTO

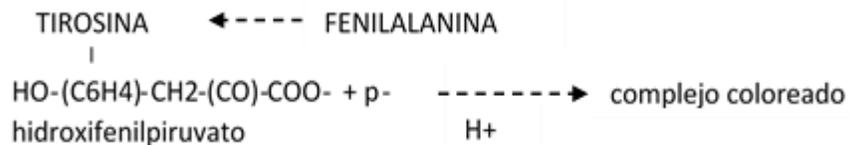
Prueba de Dinitrofenilhidracina (DNPH)

Molécula identificada: Alfa-cetoácidos (compuestos carboxílicos); cuerpos cetónicos (compuestos carbonílicos).



Prueba de Cloruro Férrico

Molécula identificada: ácido fenil pirúvico o metabolitos acumulados conteniendo grupos hidroxilo aromáticos (enoles).



V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Dinitrofenilhidracina (DNPH) al 3% en HCL 2N.

Acetona.

Cloruro férrico (FeCl₃) al 10 %.

Ácido sulfúrico (H₂SO₄) al 25 %.

Salicilato de sodio al 10 %.

Gradilla.

Tubos de ensayo de 10 ml.

Pipetas de 5 ml.



Pipetas de 1 ml.

Pipetas Pasteur plásticas.

Centrífuga.

VI. MUESTRA

Orina fresca (máximo dos horas después de la micción). Mínimo 2 ml.

Recomendación: no aplicar cremas, ni talcos en el área genital.

VII. PROCEDIMIENTO

Prueba de Dinitrofenilhidracina (DNPH)

1. Centrifugar 10 ml de orina previamente mezclada a 2.500 rpm. durante 10 minutos.
2. Realizar el montaje de la prueba del paciente y el control positivo de acetona siguiendo el siguiente esquema:

SUSTANCIA	TUBO PACIENTE	TUBO CONTROL
Sobrenadante de orina	1 ml	-----
Acetona	-----	1 ml
DNPH 3%	1 ml	1 ml

3. Mezclar.
4. Observar a los 10 minutos.
5. Positivo: opalescencia amarilla, precipitado amarillo o blanco.
Negativo: color naranja.

Prueba de Cloruro Férrico

1. Centrifugar 10 ml de orina previamente mezclada a 2.500 rpm.
2. Realizar el montaje de la prueba del paciente y el control positivo de salicilato de sodio siguiendo el siguiente esquema:



SUSTANCIA	TUBO PACIENTE	TUBO CONTROL
Sobrenadante de orina	5 ml	-----
Salicilato de Sodio	-----	5 ml
H ₂ SO ₄ 3%	1 gota	1 gota
FeCl ₃ 10%	10 gotas	10 gotas

3. Mezclar.
4. Observar el tubo durante por 2 minutos.
5. Positivo: Color verde o azul-verde que lentamente palidece pasando al amarillo, es positivo para ácido fenilpirúvico. Color púrpura o cobrizo estable corresponde a la presencia de salicilatos. Precipitado verde-negro indica melanina.
Negativo: Amarillo (puede tornarse turbio pero esto no es respuesta positiva).

Interpretación:

Prueba de Dinitrofenilhidracina (DNPH). Puede dar positivo en Fenilcetonuria, enfermedad orina de arce, acidosis láctica, síndrome de strang, hipermetioninemia, acidemia isovalérica, síndrome de smith, enfermedad de Oasthouse, síndrome de Lowe, deficiencia de fructosa 1,6 difosfatasa. leucinosis, histidinemia, glucogenosis, tirosinosis, hiperglicemia, acidemia butírica hexanoica, acidemia metilmalónica,

Prueba de Cloruro Férrico. Puede dar positivo en Fenilcetonuria, alcaptonuria, histidinemia, enfermedad de Oasthouse, tirosinosis, déficit de formimino transferasa.

Observación:

Prueba de Dinitrofenilhidracina (DNPH). Orinas normales dan falsos positivos con tiempos prolongados por reacción con aminoácidos normales. En recién nacidos es fisiológica positiva.

Prueba de Cloruro Férrico. Cualquier cambio de color amerita estudio complementario. Siempre comparar con la orina sola.



PRÁCTICA No. 8: TEST DE NITROPRUSIATO Y TEST DE NITROSONAFTOL

I. INTRODUCCIÓN

Para determinar si un individuo padece un EIM en la vía de los aminoácidos se realiza un tamizaje metabólico de aminoácidos, el cual es un conjunto de pruebas que busca determinar si la persona tiene un error metabólico en esta vía. La batería de pruebas está conformada principalmente por las pruebas de Dinitrofenilhidrazina, cloruro férrico, Nitroprusiato y Nitrosoaftol.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Aplicar diferentes técnicas para detectar errores en el metabolismo de los aminoácidos.
- Correlacionar los resultados de las técnicas ejecutadas con diagnósticos de enfermedades hereditarias metabólicas.

Objetivos específicos

- Adquirir destreza en el procedimiento de técnicas de tamizaje metabólico en el laboratorio.
- Desarrollar habilidades en la interpretación de resultados de estas pruebas.
- Correlacionar el resultado de las pruebas con posibles diagnósticos para el tratamiento y pronóstico de un caso individual, en errores de las diferentes vías metabólicas.



RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno para realizar su clase en el laboratorio debe ingresar con bata de laboratorio, gorro, máscara (tapabocas) y zapatos cerrados. Además debe llevar guantes, otros elementos de bioseguridad, así como elementos para marcar su material (cinta de enmascarar o marcador).
- Cada estudiante debe entrar a clases con una muestra de orina en un recipiente recolector de orina con mínimo 10 ml. La recolección de la muestra la puede realizar en la Corporación antes de entrar a clases.

III. MÉTODO

Colorimetría.

IV. FUNDAMENTO

Prueba de Nitroprusiato

Molécula identificada: cistina, homocistina, cisteína, homocisteína.



Prueba de Nitrosoaftol

Molécula identificada: Fenoles p-sustituidos.





V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Hidróxido de amonio concentrado (NH₄OH).

Cianuro de sodio (NaCN) al 5%.

Cisteína al 0.05%.

Nitroprusiato.

Nitrito de sodio al 2.5 %.

Ácido nítrico 2.63 N.

1-Nitroso-2-Naftol 0.1 %.

Tirosina al 0.05 %.

Gradilla.

Tubos de ensayo de 10 ml.

Pipetas de 5 ml.

Pipetas de 1 ml.

Pipetas Pasteur plásticas.

Tapones de caucho.

Centrífuga.

VI. MUESTRA

Prueba de Nitroprusiato. Orina de 24 horas.

Prueba de Nitrosonaftol. Primera orina de la mañana.

Recomendación: no aplicar cremas, ni talcos en el área genital.

VII. PROCEDIMIENTO

Prueba de Nitroprusiato

1. Centrifugar 10 ml de orina previamente mezclada a 2.500 rpm.
2. Realizar el montaje de la prueba del paciente y el control positivo de cisteína siguiendo el siguiente esquema:



SUSTANCIA	TUBO PACIENTE	TUBO CONTROL
Sobrenadante de orina	1 ml	-----
Cisteína 0.05%	-----	1 ml
NH ₄ OH concentrado	3 gotas	3 gotas
NaCN 5%	0.4 ml	0.4 ml
TAPAR Y MEZCLAR - ESPERAR 10 MINUTOS		
Nitroprusiato	3 gotas	3 gotas

3. Mezclar.
4. Observar inmediatamente.
5. Positivo: aparición inmediata de color rojo o magenta (fucsia).
Negativo: amarillo.

Prueba de Nitrosoaftol

1. Centrifugar 10 ml de orina previamente mezclada a 2.500 rpm.
2. Realizar el montaje de la prueba del paciente y el control positivo de tirosina siguiendo el siguiente esquema:

SUSTANCIA	TUBO PACIENTE	TUBO CONTROL
HNO ₃ 2.63N	1 ml	1 ml
NaNO ₂ 2.5%	1 gota	1 gota
Nitrosoaftol 0.1%	0.1 ml	0.1 ml
MEZCLAR		
Sobrenadante de orina	3 gotas	-----
Tirosina 0.05%	-----	3 gotas

3. Mezclar.
4. Observar inmediatamente.
5. Positivo: aparición de color naranja a rojo en 2-5 minutos.
Negativo: amarillo.



Interpretación:

Puede dar positivo en Cistinuria, homocistinuria, enfermedad de Wilson, síndrome de Fanconi, beta-mercapto-lactato-ciste-inidisulfiduria, lesiones tubulares renales, aminoacidurias generalizadas.

Puede dar positivo en Tirosinosis, galactosemia, disfunción hepática severa, fructosemia. Además presencia de p-hidroxi fenil ácidos como: ácido pirúvico, ácido láctico, ácido acético, ácido propiónico.

Observación:

Prueba de Nitroprusiato. La orina normal contiene grupos (-SH) libres que dan color rosado, que se considera negativo. En orinas ácidas o muy diluidas se pueden dar falsos negativos. Para evitar falsos negativos en el caso de cistina se evalúa por curva de eliminación diurna. En caso de duda entre cistina y homocistina se hace el test de nitrato de plata.

Prueba de Nitrosonaftol. Resultados falsos positivos pueden corresponder a carbohidratos, p-OH-fenilácidos o metabolitos de la tirosina.



PRÁCTICA No. 9: TEST DE IÓN CÚPRICO, TEST DE RESORCINOL Y TEST DE GLUCOSA OXIDASA

I. INTRODUCCIÓN

Los carbohidratos (CH) son moléculas orgánicas entre las que se encuentran los azúcares, almidones, glicógenos y celulosas. Los CH más sencillos son los azúcares conocidos como monosacáridos. Los monosacáridos que tienen cinco átomos de carbono se denominan pentosas, los cuales forman parte en la estructura de los nucleótidos. Los azúcares con seis átomos de carbono se llaman hexosas y comprenden: la glucosa, la galactosa y la fructosa. Estos azúcares son importantes como fuentes metabólicas de energía. Si se combinan dos monosacáridos se obtiene un disacárido. Algunos disacáridos frecuentes son: la maltosa (dos unidades de glucosa, usada en la elaboración de la cerveza), la sacarosa (una unidad de glucosa y otra de fructosa, el azúcar utilizado comercialmente) y la lactosa (una unidad de glucosa y otra de galactosa, que se encuentra en la leche). Cuando se combinan más azúcares se forman los polisacáridos, como son: el glicógeno, el almidón y la celulosa. En el hombre, el principal CH de depósito es el glicógeno, una molécula formada por largas cadenas de unidades de glucosa. Para detectar EIM en la vía de los CH, se utiliza el tamizaje de carbohidratos que también consta de varias pruebas.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

- Aplicar diferentes técnicas para detectar errores en el metabolismo de los carbohidratos.
- Correlacionar los resultados de las técnicas ejecutadas con diagnósticos de enfermedades hereditarias metabólicas.



Objetivos específicos

- Adquirir destreza en el procedimiento de técnicas de tamizaje metabólico en el laboratorio.
- Desarrollar habilidades en la interpretación de resultados de estas pruebas.
- Correlacionar el resultado de las pruebas con posibles diagnósticos para el tratamiento y pronóstico de un caso individual, en errores de las diferentes vías metabólicas.

RESPONSABILIDAD DEL ALUMNO PARA LA PRÁCTICA

- Todo alumno para realizar su clase en el laboratorio debe ingresar con bata de laboratorio, gorro, máscara (tapabocas) y zapatos cerrados. Además debe llevar guantes, otros elementos de bioseguridad, así como elementos para marcar su material (cinta de enmascarar o marcador).
- Cada estudiante debe entrar a clases con una muestra de orina en un recipiente recolector de orina con mínimo 10 ml. La recolección de la muestra la puede realizar en la corporación antes de entrar a clases.

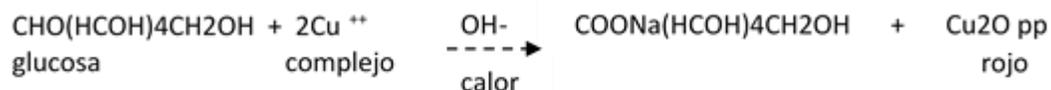
III. MÉTODO

Colorimetría.

IV. FUNDAMENTO

Prueba de Ión Cúprico

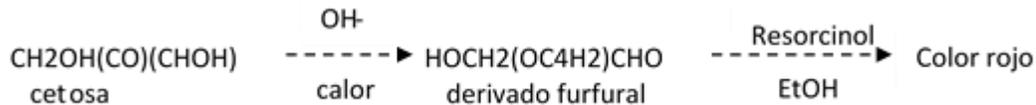
Molécula identificada: azúcares reductores.





Prueba de Resorcinol

Molécula identificada: derivados del furfural (hidroximetilfurfural). Este se forma cuando la fructosa disuelta en agua es sometida a un calentamiento a 100 °C con ácidos diluidos.



Prueba de Glucosa Oxidasa



V. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

Reactivo de Benedict.

Glucosa al 0.5 %.

Reactivo de Seliwanoff.

Fructosa al 0.5 %.

Tirillas reactivas de medición de glucosa.

Gradilla.

Tubos de ensayo de 10 ml.

Pipetas de 5 ml.

Pipetas de 1 ml.

Pipetas Pasteur plásticas.

Centrífuga.

Baño serológico a 100 grados.



VI. MUESTRA

Prueba de Ión Cúprico. Primera orina de la mañana.

Prueba de Resorcinol. Primera orina de la mañana.

Prueba de Glucosa Oxidasa. Primera orina de la mañana.

Recomendación: Informar si la dieta del paciente fue modificada antes de tomar la muestra.

VII. PROCEDIMIENTO

Prueba de Ión Cúprico.

1. Centrifugar 10 ml de orina previamente mezclada a 2500 rpm.
2. Realizar el montaje de la prueba del paciente y el control positivo de glucosa siguiendo el siguiente esquema:

SUSTANCIA	TUBO PACIENTE	TUBO CONTROL
Benedict	1 ml	1 ml
Sobrenadante de orina	0.1 ml	-----
Glucosa 0.5%	-----	0.1 ml

3. Mezclar.
4. Llevar a baño hirviente durante 3 minutos.
5. Observar durante 3 minutos.
6. Positivo: formación de precipitado o color verde.
Negativo: azul.

Observación: Descartar que no haya embarazo, diabetes o ingestión reciente de frutas que dan falsos positivos. Otros falsos positivos pueden ser ocasionados por medicamentos o metabolitos reductores.



Prueba de Resorcinol.

1. Centrifugar 10 ml de orina previamente mezclada a 2.500 rpm.
2. Realizar el montaje de la prueba del paciente y el control positivo de fructosa siguiendo el siguiente esquema:

SUSTANCIA	TUBO PACIENTE	TUBO CONTROL
Seliwanoff	5 ml	5 ml
Sobrenadante de orina	5 gotas	-----
Fructosa 0.5%	-----	5 gotas

3. Mezclar.
4. Llevar a baño hirviente durante 15 minutos.
5. Observar durante 3 minutos.

Positivo: formación de color rojo.

Negativo: amarillo.

Observación: Los resultados positivos correlacionados con el cuadro clínico indicarán estudios complementarios en el centro de referencia. Precipitado soluble en etanol, corresponde a fructosa. Las orinas alcalinas o que contengan glucosa pueden dar falsos positivos:

Prueba de Glucosa Oxidasa.

1. Mezclar la orina en su recipiente recolector.
2. Introducir la tirilla en la orina.
3. Seguir las instrucciones de la casa comercial para la lectura.

Observación:

	Glucosa	Galactosa	Fructosa
Ión cúprico	+	+	+
Resorcinol	-	-	+
Glucosa-oxidasa	+	-	-



BIBLIOGRAFÍA

Aguilar Segura María Soledad. Biología molecular y citogenética. Editorial Síntesis, 2016. ISBN 978-84-9077-349-9.

Gómez Aguado Fernando. Biología molecular y citogenética. Editorial Altamar, 2015. ISBN: 9788416415045.

Mérida De La Torre Francisco, Moreno Campoy Elvira Eva. Biología molecular y citogenética: manual para técnico superior de laboratorio clínico y biomédico. Editorial Panamericana, 2015. ISBN: 978-8491100027.

Sipan Sarrión M^a Cruz, Cuenca Pardo Juan Bautista, Caparrós Manuel Mota. Biología molecular y citogenética. S.A. ediciones Paraninfo, 2016. ISBN: 9788428338318.

Ministerio de Salud. Instituto Nacional de Salud. Citogenética Humana. Manual de procedimientos. Bogotá. 1991.

Barrera Avellaneda Luis Alejandro, Espejo Mojica Angela Johana, Eugenia Espinosa García, Echeverri Peña Olga Yaneth (editores). Errores Innatos del Metabolismo. Un abordaje integral del diagnóstico al tratamiento. Editorial Javeriana, 2014. ISBN: 9789587164657.



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.

