



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA
RAFAEL NÚÑEZ

PARA QUE TU DESARROLLO CONTINÚE SU MARCHA

GUÍA DE LABORATORIO DE
INMUNOLOGÍA

III Semestre

Adriano Martínez Villareal.

M.D. M.Sc.

Andrés Sánchez Caraballo Biol.

M.Sc.

Facultad de Ciencias de la Salud

Programa de Medicina





© **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 Medicina

Heliana María Padilla Santos

Mónica Rocha Carrascal

Director de Biblioteca Miguel Henríquez Castañeda-Cartagena

Luis Fernando Rodríguez L.

Revisión técnica disciplinar

Marlon Múnera

Revisión y corrección de estilo

Raúl Padrón Villafañe

Autor

Adriano Martínez Villareal

Andrés Sánchez Caraballo



CONTENIDO

| | |
|--|-----|
| PRESENTACIÓN | 4 |
| NORMAS GENERALES DE BIOSEGURIDAD EN EL LABORATORIO..... | 5 |
| PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE | 6 |
| MATERIALES PARA TODAS LAS CLASES | 7 |
| PRÁCTICA N° 1 IDENTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE COLORACIÓN DE WRIGHT | 8 |
| PRÁCTICA N° 2 RECUENTO DE LEUCOCITOS | 111 |
| PRÁCTICA N° 3 REVISIÓN DE TEMA N° 1: TÉCNICAS DE LABORATORIO BASADAS EN REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO | 15 |
| PRÁCTICA N° 4 DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA COMO MARCADOR DE RESPUESTA INFLAMATORIA, MEDIANTE UNA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN..... | 19 |
| PRÁCTICA N° 5 DETERMINACIÓN DE C3 POR TURBIDIMETRÍA | 22 |
| PRÁCTICA N° 6 DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA (hCG) EN SUERO HUMANO CON UNA TÉCNICA ELISA | 25 |
| PRÁCTICA N° 7 REVISIÓN DE TEMA N°2: TECNOLOGÍAS DE VANGUARDIA ÚTILES EN INMUNOLOGÍA..... | 28 |
| PRÁCTICA N° 8 PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD | 30 |
| PRÁCTICA N° 9 DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA | 34 |
| BIBLIOGRAFÍA | 38 |



PRESENTACIÓN

La Inmunología, ciencia que se ocupa del estudio de las respuestas de defensa del organismo frente a una amplia variedad de agresiones, ha venido ganando importancia en la estructuración de los saberes y competencias que deben poseer los profesionales de la salud. Dicha importancia es fruto de las relaciones estrechas que mantiene el sistema inmunitario con el funcionamiento de los demás órganos y aparatos del cuerpo; por tanto, las respuestas inmunes alteradas pueden conducir a enfermedades que pueden ser sistémicas o afectar prácticamente a cualquier órgano de la economía humana.

Del mismo modo, la comprensión de las reacciones que se establecen entre algunos componentes inmunitarios como los anticuerpos y sus correspondientes antígenos ha permitido el desarrollo de numerosas técnicas y procedimientos destinados a diagnosticar y tratar enfermedades. Estas técnicas son realizadas en laboratorios con diferentes niveles de complejidad e incluyen procedimientos tan simples y rutinarios como la tipificación de los grupos sanguíneos hasta sofisticadas técnicas de microscopía y citometría de flujo. Ahora bien, teniendo en cuenta que el diagnóstico y el tratamiento de las enfermedades constituyen dos pilares fundamentales en la formación de los médicos la presente guía tiene por objeto proporcionarles a los estudiantes de Medicina las competencias procedimentales, así como las habilidades para interpretar las pruebas y técnicas del laboratorio de Inmunología más relevantes para el ejercicio de la profesión médica.

Los autores.



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 cortopunzantes 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.
- Todo material contaminado deberá ser descartado en la caneca roja.
- 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 descontaminadas con una solución de hipoclorito de sodio al 7%.

PLAN DE TRABAJO DEL ESTUDIANTE

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 necesarias 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 los tubos.
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. Guantes desechables.
3. Mascarilla o tapabocas.
4. Gafas de protección.
5. Cofa.
6. Muestra solicitada.
7. Papel absorbente.
8. Guías de laboratorio previamente estudiadas.
9. Folder. Tema y # de la práctica a desarrollar, objetivos, materiales, procedimiento, resultados (Dibujos), conclusión personal y desarrollo de talleres.
10. Papel logarítmico, lápiz, borrador, sacapuntas, calculadora.

INDISPENSABLES EN TODOS LOS LABORATORIOS.



PRÁCTICA N° 1

IDENTIFICACIÓN DE LEUCOCITOS EN SANGRE PERIFÉRICA MEDIANTE COLORACIÓN DE WRIGHT

I. INTRODUCCIÓN

Los leucocitos o glóbulos blancos son células sanguíneas que cumplen funciones de defensa y tienen la capacidad de migrar hacia el espacio extracelular durante el curso de las reacciones inflamatorias. Exhiben diferentes tamaños, contenido citoplasmático y forma del núcleo; estas características han permitido clasificarlos en granulocitos y agranulocitos, polimorfonucleares y mononucleares, entre otros. Cada uno de estos leucocitos presenta funciones específicas dentro del sistema de defensa. Además, en el caso de los granulocitos, dependiendo de la afinidad que tengan por los colorantes básicos y ácidos, se clasifican en basófilos, eosinófilos y neutrófilos. El valor normal de leucocitos en un individuo adulto es de 5.000 a 10.000 por mm³ de sangre. En esta práctica se realizará un extendido de sangre periférica y se realizará una tinción con la coloración de Wright para identificar los diferentes leucocitos de sangre periférica.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar, mediante coloración de Wright, los leucocitos de sangre periférica.

Objetivo específico

Conocer la estructura y función de los leucocitos

III. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- Reloj con minuterero.
- Cubeta para tinción.
- Dos varillas o rejillas.



- Frasco lavador con agua destilada.
- Pipetas Pasteur.
- Solución tampón de fosfato ph 6.4 (opcional)
- Papel filtro.
- Colorante Wright.

IV. MUESTRA

Sangre capilar o sangre venosa anti coagulada con EDTA

V. PROCEDIMIENTO

Desinfectar con alcohol la yema del dedo medio o anular.

Pinchar la zona desinfectada con una lanceta estéril. Presionar hasta obtener una o dos gotas de sangre.

Depositar las gotas de sangre en un portaobjeto y con otro portaobjeto realizar un extendido (ver figura). Dejar secar al aire.

Agregar al extendido colorante de Wright y esperar 3-4 minutos.

Agregar agua destilada y esperar 1 minuto.

Enjuagar cuidadosamente con agua del grifo.

Dejar secar.

Aplicar aceite de inmersión.

Observar en un microscopio con objetivo de 100X

VI. TALLER PRE- LABORATORIO

1. Fundamento de la coloración de Wright, Giemsa.
2. Características morfológicas de: Linfocito, monocito, eosinófilo, basófilo, eritrocito, neutrófilo y plaquetas. ¿Qué sustancias componen los gránulos de los eosinófilos, basófilos y neutrófilos?
3. ¿Qué es el Frotis de sangre periférica? ¿Qué utilidad clínica tiene el frotis de sangre periférica?



4. Valores de referencia de Neutrófilos, monocitos, eosinófilos, basófilos, linfocitos, eritrocitos y plaquetas en el cuadro hemático para adultos y niños.

VII. TALLER POS LABORATORIO

1. Dibuje cada célula que observa, clasifíquelas.
2. ¿Cuáles son los componentes del reactivo de Wright? ¿Por qué el núcleo de los polimorfonucleares se tiñe de color violeta?
3. ¿Qué otros colorantes se usan para visualizar leucocitos?
4. Describa tres trastornos que sean consecuencia de alteraciones en el número o función de los leucocitos.



PRÁCTICA Nº 2

RECuento DE LEUCOCITOS

I. INTRODUCCIÓN

La cantidad de leucocitos en la sangre constituye un parámetro constante para cada especie, con algunas variaciones naturales dependientes a factores como la edad y al sexo. Pero los valores de estas células pueden verse alteradas en determinadas circunstancias, como son las alteraciones intrínsecas del individuo o la presencia de un patógeno.

El recuento de células hemáticas, tanto de eritrocitos como de leucocitos, es una de las pruebas clásicas en analítica clínica. Entre los leucocitos encontramos los neutrófilos, basófilos, eosinófilos, monocitos (o macrófagos y dendríticas en su estado maduro) y linfocitos B y T (que a la vista en el microscopio son indiferenciables). La identificación de estas células se basará en la morfología, tamaño y coloración que adquiera después de la tinción. Una alteración en el número de alguno de estas células nos puede indicar el tipo de infección y estado en que se encuentra. El recuento de plaquetas no se suele hacer, salvo cuando se sospecha que el paciente tiene alguna anomalía grave (normalmente de tipo leucémico). Además, permiten detectar anomalías como anemias y policitemias en el caso de los glóbulos rojos, y leucopenias y leucocitosis en el de los glóbulos blancos.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la concentración de los distintos leucocitos presentes en la sangre.



Objetivo específico

Conocer las funciones de las células de la respuesta inmunológica y el papel que cumplen ante los diferentes patógenos.

III. FUNDAMENTO

La sangre se diluye 1:20 con una solución hipotónica de ácido acético que destruye a los eritrocitos. El azul de metileno permite reconocer fácilmente el líquido y observar mejor los glóbulos blancos, a los que tiñe ligeramente.

IV. REACTIVOS, MATERIALES Y EQUIPOS

- EDTA (sal disódica) al 10 %.
- Líquido de Turk: Ácido acético glacial 3.0 ml + Agua destilada c.b.p. 100 ml + Adicionar 1 o 2 gotas de azul de metileno.
- Tubos de ensayo de 13 x 100mm -Pipeta de Thoma para glóbulos blancos.
- Cámara de Neubauer -Microscopio –Gasa.
- Sangre capilar o venosa con anticoagulante (EDTA ó Heparina).

V. MUESTRA

Sangre capilar o sangre venosa anticoagulada con EDTA.

VI. PROCEDIMIENTO

- 1.- Llenar la pipeta con sangre bien mezclados hasta la marca de 0.5.
- 2.- Limpiar cuidadosamente la pipeta por fuera.
- 3.- Aforar con solución de Turk hasta la marca de 1.
- 4.- Agitar la pipeta durante 3 min.
- 5.- Se prepara la cámara de recuento (Neubauer) con el cubreobjetos y se vuelve a agitar la pipeta durante 2 ó 3 min. (no con demasiada energía, para evitar que se rompan las células). Se eliminan las primeras gotas de líquido (4 a 5 gotas) que ocupan la porción capilar de la pipeta, pues en esa zona el líquido está exento de



células, y se apoya la punta de la pipeta (formando un ángulo de aproximadamente 35°) en el borde del cubreobjetos.

6.-Dejar reposar la cámara durante 3 min.

7.- En el microscopio con el objetivo de 10x, se cuentan los leucocitos presentes en los cuatro cuadros grandes de los extremos.

Principio del recuento

La cámara de recuento (de Neubauer) consiste en una gruesa capa de vidrio con unas plataformas centrales que son exactamente 0.1 mm más bajas que las laterales. En las plataformas centrales existe una cuadrícula.

Los lados de los cuadrados grandes de la cámara de Neubauer son de 0.25 mm. La altura entre el cubreobjetos y la cámara central es de 0.1 mm.

Normalmente se utiliza la cámara de Neubauer (los cuadrados grandes para el recuento de leucocitos, y los pequeños para el de hematíes). Una vez realizado el recuento, los resultados deben expresarse en número de células por milímetro cúbico de sangre.

$$\text{n}^{\circ} \text{ céls./mm}^3 \text{ de sangre} = \text{Células contadas} \times 20 \text{ (dilución)} \times 10 \text{ (corrección de altura)} / 4 \text{ (n}^{\circ} \text{ de cuadro de 1mm contados)}$$

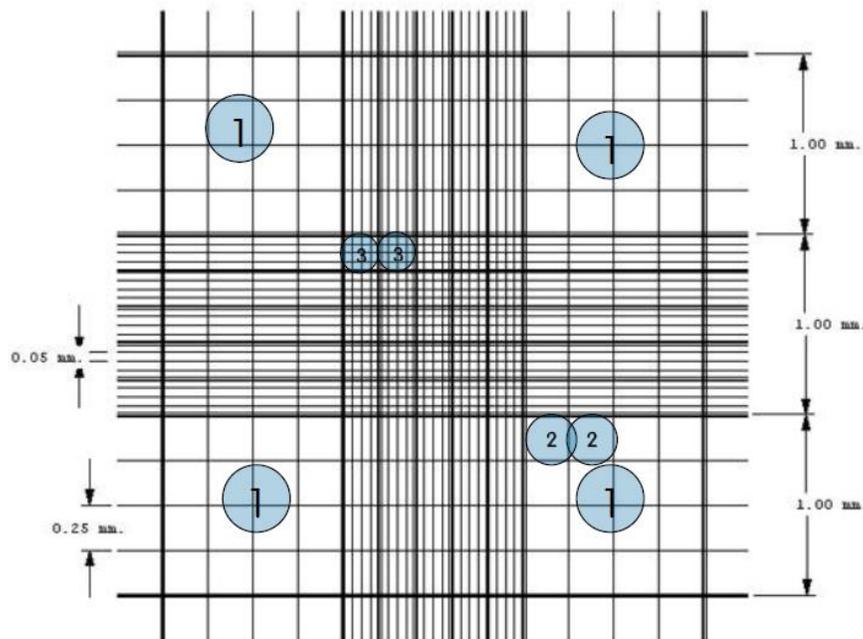
Cada persona debe realizar el recuento en los 4 cuadrantes y hallar la media, antes de calcular la concentración de células.

Ojo: Este factor varía si se cambia la dilución y o el número de cuadros contados.

Valores de referencia

Leucocitos:

- Adultos: 5000 - 10 000 / mm³
 - Recién nacidos: 10 000 - 25 000 / mm³
 - Niños: 8000 - 15 000 / mm³
- *Cuenta diferencial leucocitaria



**Detalle de las
rejillas de la
cámara de
Neubauer.**

- 1) Cuadrantes para conteo de Leucocitos.
2. Cuadrantes para identificación de leucocitos.
3. Cuadrante para conteo de hematíes.

Tomado de: Technical Note. Conteo celular con hematocito.

VII. Taller Pre laboratorio:

1. ¿Qué función tiene el reactivo de Turk?
2. ¿Qué es una Cámara de Neubauer, para qué sirve?
3. Valores de referencia de leucocitos para adultos, niños.



PRÁCTICA N° 3

REVISIÓN DE TEMA N° 1: TÉCNICAS DE LABORATORIO BASADAS EN REACCIONES ANTÍGENO-ANTICUERPO

I. INTRODUCCIÓN

Los análisis cuantitativos y cualitativos en la medicina moderna han permitido avanzar en el diagnóstico de enfermedades. La inclusión de técnicas basadas en reacciones inmunológicas ha representado un avance importante en el análisis de sustancias de interés, difíciles de analizar empleando los métodos habituales. Dentro de estos procedimientos inmunológicos los más útiles y prácticos son aquellos basados en la especificidad que hay en la unión entre antígeno y anticuerpo (Ag-Ac).

Un antígeno (Ag) es cualquier molécula reconocida específicamente por un anticuerpo o un receptor de linfocito T (TCR) a través de un complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Los anticuerpos (Ac), también llamados inmunoglobulinas (Igs) o gamaglobulinas son glicoproteínas disueltas en los líquidos corporales (sangre, líquido cefalorraquídeo, leche, entre otros) que pueden neutralizar antígenos de patógenos y/o activar mecanismos celulares y humorales destinados a combatirlos. La propiedad que tienen los Ac de unirse a un Ag, la especificidad de esta unión y el hecho de que sea visible por los fenómenos de precipitación, aglutinación y otros mecanismos indirectos (marcaje con fluoresceína, con radioisótopos o con enzimas) hace que estos métodos sean muy útiles en la medicina.

II. Objetivos

Objetivo general

Comprender el fundamento teórico y metodológico de las diferentes técnicas inmunológicas.



Objetivo específico.

Aprender la utilidad de las técnicas de ag – ac en la medicina e investigación.

III. Método.

Se describen y presentan los diversos métodos basados en procedimientos distintos para visualizar la unión Ag-Ac. Dichos métodos incluyen a los siguientes:

-Técnicas de aglutinación. Cuando el antígeno se encuentra unido al patógeno (bacterias, protozoos, hongos o helmintos, entre otros) o a alguna molécula de transporte, la reacción Ag-Ac puede ser detectada y cuantificada por el aglutinado resultante.

-Técnicas de precipitación. El Ag y el Ac se encuentran en una solución líquida o sólida. Al unirse se forman precipitados que se pueden evidenciar por métodos, usualmente indirectos. Entre dichos métodos están la inmunodifusión radial, la turbidimetría y la nefelometría.

-Técnicas basadas en la emisión de radioactividad, reacciones enzimáticas, emisión de fluorescencia y quimioluminiscencia. El anticuerpo es marcado para medir la concentración del antígeno o anticuerpo presente. Dependiendo del tipo de marca y la tecnología de detección utilizada los inmunoensayos se clasifican en:

- **Radioinmunoanálisis (RIA):** se utilizan isótopos radioactivos como marca y la cantidad de radioactividad medida indica la concentración de analito presente.
- **Inmunoensayo enzimático (EIA):** se utilizan enzimas que catalizan la reacción, típicamente fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante y galactosidasa B. En EIA la reacción Ag-Ac se revela por un cambio de color, emisión de luz u otra señal.



-Técnicas de fluorescencia. Incluyen la inmunofluorescencia directa e indirecta, los inmunofluoroensayos y la citometría de flujo. La marca está constituida por un fluorocromo; el complejo Ag-Ac puede visualizarse en un microscopio o detectarse por la cantidad de fluorescencia emitida.

-Técnicas quimioluminiscentes. Como marca se usa un compuesto quimioluminiscente el cual emite luz cuando se le combina con un reactivo. Los compuestos quimioluminiscentes son distintos de los marcados radioactivos, fluorescentes o enzimáticos.

-Técnicas electroforéticas e inmunocromatográficas. Algunas técnicas como la inmunoprecipitación y el western blot incluyen separaciones electroforéticas combinadas con algunas de los métodos de detección descritos anteriormente para documentar la presencia de un antígeno o un anticuerpo en una muestra. Otros ensayos inmunológicos aprovechan el principio de la cromatografía para identificar el analito de interés.

IV. Taller de Preguntas

1. Elabore un mapa conceptual o mental acerca de las técnicas basadas en las reacciones antígeno-anticuerpo. Tenga en cuenta las siguientes clasificaciones: inmunoensayos directos e indirectos, competitivos y no competitivos, homogéneos y heterogéneos.
2. Averigüe el fundamento de las técnicas basadas en reacciones de precipitación, es decir, inmunodifusión radial, nefelometría y turbidimetría. Represente gráficamente dichas técnicas. Haga una lista de sustancias que pueden determinarse con estas técnicas.



3. Imagine que usted trabaja en un centro de investigación de vanguardia y le encomiendan la misión de diseñar un inmunoensayo para diagnosticar una enfermedad infecciosa responsable de una reciente epidemia que ha dejado cientos de muertos y para la cual aún no existe prueba diagnóstica. Elija un tipo de inmunoensayo y describa los pasos que seguiría para desarrollar la prueba.



PRÁCTICA N° 4

DETERMINACIÓN DE LA PROTEÍNA C REACTIVA COMO MARCADOR DE RESPUESTA INFLAMATORIA, MEDIANTE UNA TÉCNICA DE AGLUTINACIÓN

I. INTRODUCCIÓN

La respuesta inmune innata es la primera línea de defensa y está conformada por las barreras físicas y químicas. Durante esta respuesta se generan múltiples mediadores inflamatorios que actúan tanto a nivel local como sistémico. Esta respuesta puede ser inducida por diversos estímulos, ya sean infecciosos, mecánicos (herida), físicos, químicos. Entre el grupo de mediadores secretados, encontramos las citoquinas IL-1 y la IL-6, la primera es considerada un pirógeno endógeno que actúa a nivel del hipotálamo para incrementar el umbral de la temperatura y la segunda induce la producción de proteínas de fase aguda en el hígado.

Una de las proteínas de fase aguda es la proteína C reactiva (PCR) la cual es producida por el hígado y los adipocitos. Es miembro de la familia de las pentraxinas y está constituida por cinco subunidades idénticas codificadas por un solo gen ubicado en el cromosoma 1. Su peso molecular es de aproximadamente 118 KD. Fue descubierta en 1930 por Tillet y Francis en los sueros de pacientes con cuadros agudos de neumonía neumocócica. Su nombre se debe a que forma un precipitado con el polisacárido somático C del neumococo, en presencia de iones calcio. Se produce en una amplia variedad de fenómenos inflamatorios extensos, degenerativos agudos y neoplásicos; su hallazgo es pues complementario a otros parámetros de actividad patológica, como la sedimentación globular y las enzimas celulares en suero. Se liga a la fosforilcolina de los microorganismos. Colabora con el complemento ligándose a células extrañas y dañadas, favorece la fagocitosis hecha por macrófagos, células que expresan un receptor para ella. Por tanto, la PCR desempeña un papel importante en la inmunidad innata como parte de un sistema de defensa temprano contra infecciones.



La determinación de la PCR se hace utilizando pruebas de aglutinación de partículas de látex. Dichas partículas están recubiertas con anticuerpos específicos contra la Proteína C reactiva humana. La PCR presente en la muestra (suero puro o diluido) provoca la aglutinación de las partículas. La aglutinación es proporcional a la concentración de PCR presente en la muestra.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar el fundamento teórico de la prueba para determinación de PCR y reconocer la importancia y utilidad clínica de las pruebas en la conducta de manejo de los pacientes.

Objetivo específico

Identificar el papel de la PCR en las enfermedades inflamatorias.

III. MATERIALES Y REACTIVOS

- Kit para determinación de PCR por aglutinación.
- Muestra de suero refrigerada.
- Cuadriculas para aglutinación.
- Palillos de madera.

IV. MUESTRA

Suero

V. PROCEDIMIENTO

1. Diluir la muestra de suero y colocar la muestra pura y las diluciones en cuadriculas independientes.



2. Agregar una gota del control positivo y negativo del kit.
3. Agregar una gota del reactivo de partículas de látex.
4. Observar y remover suavemente con el palillo de madera en caso de ser necesario, esperar al menos 3 minutos.
5. Registrar los resultados.

VI. TALLER PRE LABORATORIO

1. ¿Cuál es el valor clínico de la prueba de PCR?
2. ¿En qué situaciones se aumenta y en cuales se disminuye PCR?
3. ¿Qué otras técnicas se utilizan para determinar PCR?
4. Según los conocimientos, si un paciente le muestra una PCR positiva, ¿qué conducta tomaría?
5. ¿Cuál es el fundamento de la técnica PCR?

VII. TALLER POS LABORATORIO

1. ¿Explique qué es una aglutinación directa, e indirecta?
2. Ejemplos de pruebas de aglutinación son la identificación de grupos sanguíneos, Rh, proteína C reactiva. ¿Cuál es la importancia clínica de estas pruebas (cada una)?



PRÁCTICA N° 5 DETERMINACIÓN DE C3 POR TURBIDIMETRÍA

I. INTRODUCCIÓN

El Sistema del Complemento es un conjunto de proteínas plasmáticas que se activan en cascada y cuyo efecto final es provocar la lisis de las membranas celulares sobre las cuales se activa el sistema. Estas proteínas hacen parte de la inmunidad innata y por ello constituyen una primera línea de defensa frente a una variedad de agentes patógenos. El Complemento se activa por tres vías: clásica, alterna y MBL o de las Lectinas, y las proteínas que lo integran pertenecen a uno de los tres componentes siguientes: circuito de activación, proteínas reguladoras y receptores. C3 es la proteína del Complemento más abundante del plasma, hace parte del circuito de activación y juega un papel central en el sistema ya que en su activación convergen las tres vías. Durante la activación del sistema, esta proteína genera varios fragmentos de los cuales los más importantes son el C3a que se comporta como una anafilotoxina, es decir, favorece la vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular durante las reacciones inflamatorias agudas, y el C3b que se fija a receptores celulares para opsonizar partículas y favorecer la fagocitosis de las mismas o potenciar la remoción de complejos inmunes circulantes. Por ello, las deficiencias de C3 suelen causar susceptibilidad a infecciones bacterianas severas y trastornos por depósito de complejos inmunes como el lupus eritematoso sistémico y las glomerulonefritis.

En esta práctica se determinará por turbidimetría el C3 presente en el suero.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Medir por turbidimetría los niveles de C3 en suero humano.



Objetivo específico

Identificar el papel de las proteínas del complemento en la respuesta inflamatoria.

III. MATERIALES Y REACTIVOS

- Kit para determinación de C3 por turbidimetría. Contiene reactivo A.
- Calibradores.
- Espectrofotómetro.
- Baño de agua a 37°C.
- Cubetas.
- Centrífuga.
- Tubos de ensayo.
- Jeringas.
- Alcohol 13.
- Algodón.
- Guantes

IV. MUESTRA

Suero o plasma

V. PROCEDIMIENTO

1. Precalentar los reactivos y el instrumento a 37°C
2. Pipetear en una cubeta

| | |
|---|-------|
| Reactivo A | 1 mL |
| Agua destilada (Blanco), Calibrador o Muestra | 10 uL |

3. Mezclar e insertar la cubeta en el instrumento
4. Leer la absorbancia del Blanco, de los Calibradores y de la Muestra a 340 nm a los 5 minutos de la adición de la muestra.



VI. TALLER PRE LABORATORIO

1. Fundamento de la técnica de turbidimetría y ¿para qué sirve?
2. ¿Qué función tiene la fracción C3 del complemento?
3. Importancia clínica de la determinación de la fracción C3.
4. ¿Qué tipo de muestra se usa para esta técnica, suero o plasma?



PRÁCTICA N° 6

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA DE GONADOTROPINA CORIÓNICA HUMANA (hCG) EN SUERO HUMANO CON UNA TÉCNICA ELISA

I. INTRODUCCIÓN

La gonadotropina coriónica humana (hCG) es una hormona glicoproteica secretada por las células trofoblásticas del tejido placentario. Sus niveles se elevan rápidamente durante las primeras semanas de embarazo alcanzando el nivel más alto entre las semanas 8-12. Por ello, esta hormona se considera el marcador más importante de la gestación y se utiliza como prueba de embarazo. Además, dado que las células trofoblásticas anormales propias de la mola hidatiforme y el coriocarcinoma (enfermedades caracterizadas por hiperplasia del trofoblasto y del genoma paterno), producen grandes cantidades de gonadotropina coriónica, la determinación de hCG también es útil como marcador tumoral en el diagnóstico y seguimiento de la enfermedad trofoblástica.

En esta práctica se determinarán mediante ELISA (Ensayo Inmunodisorbente Ligado a Enzima, por sus siglas en inglés) los niveles de hCG en suero humano.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar mediante ELISA los niveles de hCG en suero humano.

Objetivo específico

Conocer la importancia del ELISA en las pruebas diagnósticas.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

- Kit para la determinación de hCG. Contiene:
 - Tiras de micropocillos.



- Calibradores (tapa blanca). Concentraciones de hCG en UI/L (A): 0 (B):5 (C): 25 (D): 50 (E): 100 (F): 250.
- Conjugado enzimático- anticuerpo (tapa blanca).
- Solución de lavado (tapa negra).
- Reactivo sustrato A (tapa amarilla).
- Reactivo Sustrato B (tapa azul).
- Solución de parada (tapa roja).
- Tira adhesiva.
- Lector de ELISA.
- Centrífuga.
- Jeringas, guantes, tubos de ensayo.

Preparación de los reactivos

Todos los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes del uso.

Preparación de la solución de trabajo de lavado. Diluir 2 ml de la solución de lavado en 100 ml de agua desionizada.

Preparación de la solución de trabajo sustrato. Mezclar 1 ml de sustrato A con un ml de sustrato B.

Muestras: usar suero. No usar muestras hiperlipémicas o hemolizadas.

IV. PROCEDIMIENTO

- Pipetear en los pozos correspondientes 25 ul de cada calibrador, de cada muestra y del blanco (agua destilada).
- Adicionar a cada pozo 100 ul del conjugado enzimático-anticuerpo (tapa blanca).
- Mezclar y cubrir con tira adhesiva.
- Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.



- Lavar tres veces. Para el lavado se aspira el contenido de cada pozo, se agregan 300 ul de solución de lavado, se aspira el contenido después de aproximadamente 30 segundos y se repite el procedimiento para un total de 3 lavados. Después del lavado se remueve el líquido remanente invirtiendo los micropocillos sobre el papel absorbente.
- Pipetear en cada pozo 100 ul de solución de sustrato.
- Incubar durante 15 minutos a temperatura ambiente en oscuridad.
- Adicionar a cada pozo 50 ul de solución de parada.
- Mezclar cuidadosamente.
- Medir la absorbancia a 450 nm lo más pronto posible o dentro de 10 minutos después de terminar la reacción usando una longitud de onda de referencia de 630-690 nm.
- **Construir una curva de calibración con los resultados. Graficar en papel milimetrado anotando en el eje de las Y las absorbancias y en el eje de las X las concentraciones**

V. TALLER PRE LABORATORIO

1. Fundamento de la técnica de ELISA directa, indirecta, competitiva y sándwich. Si es posible grafique.
2. ¿Para qué sirve la técnica de ELISA?
3. ¿Para qué se hace la determinación de hCG en mujeres y hombres?



PRÁCTICA N° 7

REVISIÓN DE TEMA N°2: TECNOLOGÍAS DE VANGUARDIA ÚTILES EN INMUNOLOGÍA

I. INTRODUCCIÓN

El descubrimiento de los mecanismos que gobiernan los procesos de replicación y transcripción del DNA, el desciframiento de la secuencia genómica de muchas especies incluyendo la humana, el avance de las técnicas de microscopía y la posibilidad de realizar marcajes para observar procesos celulares en tiempo real, el aprovechamiento del potencial de las células madre para generar diferentes tejidos y la fabricación de artefactos en escala microscópica con aplicaciones médicas, entre otros avances, han dado lugar al desarrollo de diferentes tecnologías que han resultado útiles o prometen serlo en lo que tiene que ver con la investigación de las respuestas inmunitarias y sus aplicaciones diagnósticas y terapéuticas.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Conocer las tecnologías de vanguardia utilizadas en inmunología.

Objetivo específico

Conocer la importancia de las tecnologías de vanguardias en inmunología aplicadas en la medicina.

Algunas de las tecnologías mencionadas son:

- Reacción en cadena de la polimerasa estándar y en tiempo real.
- Tecnología del DNA recombinante.
- Terapia génica.
- Tecnología del RNA interferente.
- Citometría de flujo (con Sorter).



- Análisis *in Silico* (Genómica y proteómica).
- Proteína verde fluorescente.
- Nanomedicina.
- Tecnologías basadas en el uso de células madre.

Actividades a desarrollar

- 1) Se conformarán grupos de 4 a 6 estudiantes.
- 2) Cada grupo consultará un tema y lo presentará a manera de seminario.



PRÁCTICA Nº 8

PRUEBAS DE HIPERSENSIBILIDAD

I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades alérgicas como el asma, la rinitis y la dermatitis atópica son consideradas un problema de salud pública, ya que presentan una alta tasa de morbilidad en todas las edades y estratos socioeconómicos. Así mismo, diferentes investigaciones muestran un incremento en la prevalencia de estas enfermedades alrededor del mundo, señalando que cerca de la tercera parte de la población general presenta problemas alérgicos. Este aumento, según varios estudios, está relacionado con factores socioeconómicos, sanitarios y ambientales. Las alergias son consideradas enfermedades complejas, pues en su inicio participan factores genéticos y ambientales (ácaros, pólenes, fármacos, parásitos), es decir, que son enfermedades multifactoriales.

Para el diagnóstico de estas enfermedades se encuentran las pruebas cutáneas (intradérmicas y epidérmicas), las pruebas de provocación (nasal, conjuntival, oral), la liberación de histamina por parte de los basófilos y diversas pruebas serológicas *in vitro*. Estas pruebas deben ser realizadas por personal capacitado, pues en algunos casos podrían generar complicaciones.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Identificar las técnicas que se utilizan para el diagnóstico de alergias y reconocer su valor clínico.

Objetivo específico

Conocer la importancia de las alergias como un problema de salud pública.



III. MATERIALES Y REACTIVOS

- Solución salina 0,9%.
- Penicilina cristalina 1.000.000 U.
- Jeringas para insulina.
- Jeringas de 10 cc.
- Trozos de frutas frescas.
- Lancetas.
- Algodón.
- Alcohol.
- Histamina fosfato (2,7 mg/ml equivalente a 1 mg/ ml de histamina base).
- Epinefrina dilución 1: 1000 en caso de que ocurra una reacción.

IV. PROCEDIMIENTO

Prueba de sensibilidad a la penicilina (10 U de penicilina en 0.1 ml de cloruro de sodio 0.9%)

1. Seleccionar un voluntario sin antecedentes de reacciones a penicilinas y proceder a la asepsia del antebrazo.
2. Marcar con paréntesis el sitio del antebrazo izquierdo donde se aplicará el antígeno diluido.
3. Diluir la ampolla de penicilina cristalina 1.000.000 U en 10 cc de solución salina 0.9%, agitar hasta que quede bien mezclada. Esta mezcla tiene una concentración de 100.000 U de penicilina por cada mililitro.
4. Tomar 0.1 cc de la mezcla anterior y llevar hasta 1 cc de solución salina 0.9%. Queda una solución de 10.000 U de penicilina en 1 ml



5. Luego se toma 0.1 ml de la mezcla anterior y se lleva a 1 ml adicionando cloruro de sodio 0.9%. Queda una solución de 1000 U de penicilina en 1 ml, es decir, 100 U de penicilina por cada 0.1 ml.
6. Luego se toma 0.1 ml de esta mezcla y se lleva a 1 ml adicionando cloruro de sodio 0.9%. Esta mezcla tiene una concentración de 100 U de penicilina por ml o de 10 U por 0.1 ml
7. Previa asepsia de la cara anterior del antebrazo izquierdo, en su tercio medio se hace aplicación intradérmica (ángulo de 30°) de 0.1 ml (1 décima) de la última dilución. Se utilizan jeringas de tuberculina o insulina y agujas calibre 25- 30 de calibre corto. Si queda subcutánea deberá repetirse. El volumen aplicado produce una pápula de 3-4 mm.
8. Simultáneamente en el antebrazo derecho se aplica 0.1 ml de cloruro de sodio 0.9% que ha servir de control. Luego de estas aplicaciones aparece una pequeña pápula cuyos bordes deben ser delineados con tinta para luego poder evaluar si aumentó o no de tamaño.
9. A los 20 minutos se miden ambas pápulas y se miden. Si sólo hay eritema se le da valor a aquel de 11 mm o más. Si hay pápula y eritema pequeño se mide la pápula y se considera positiva si es 5 mm mayor que la del control.

Pruebas con alimentos frescos (“prick to prick”)

1. Escoger voluntarios y realizar interrogatorio sobre la presencia de síntomas hacia esos alimentos.
2. Realizar la asepsia del antebrazo y marcar los sitios de aplicación de los antígenos.
3. Con una lanceta pinchar el trozo de alimento y enseguida el brazo del voluntario.



4. Incluir control negativo (solución salina 0.9%) y control positivo (histamina fosfato-2,7 mg/ml)
 5. Esperar 15 minutos y luego medir los diámetros de las pápulas del control negativo y los alérgenos. El control positivo se lee a los 10 minutos.
- La prueba será positiva si el diámetro de los alimentos es mayor 3 mm que el control negativo.

V. TALLER PRE LABORATORIO

1. ¿Qué es Prick test, o prueba cutánea de sensibilización?
2. ¿Otras pruebas de ayuda diagnóstica en la alergia son el recuento de basófilos en moco, el recuento de IgE total y específica, porque son de ayuda diagnóstica?
3. ¿En qué consiste la prueba de liberación de histamina?
4. ¿Qué es un alérgeno?

VI. TALLER DE PREGUNTAS

1. ¿Cuál es el valor clínico de las pruebas de alergia?
2. ¿Cuál es la sensibilidad y la especificidad de las pruebas cutáneas?
3. ¿Cuáles son los tipos de pruebas cutáneas?
4. ¿Cuáles son las técnicas para realizar las pruebas cutáneas epidérmicas?



PRÁCTICA Nº 9

DETERMINACIÓN DE ANTICUERPOS ANTINUCLEARES POR INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA

I. INTRODUCCIÓN

Como su nombre lo indica, los anticuerpos antinucleares (ANAS) constituyen un grupo amplio de autoanticuerpos dirigidos contra estructuras antigénicas localizadas en el núcleo de las células de muchos órganos y tejidos. Por ello, se asocian frecuentemente con enfermedades autoinmunes de carácter sistémico. Algunos de los más reconocidos son los anti- ADN, antihistona, anticentrómero, anti RNP, anti Sm, anti SS-A/Ro, anti SS-B/La y anti Scl 70. La determinación de estos autoanticuerpos es útil en el diagnóstico y seguimiento de enfermedades como el lupus eritematoso sistémico, la esclerosis sistémica, el síndrome de Sjögren, las vasculitis, la enfermedad mixta del tejido conjuntivo, etc. Las técnicas para hacer la mencionada determinación son principalmente la inmunofluorescencia indirecta (IFI) y el enzimoimmunoanálisis.

| SOSPECHA CLÍNICA | ANAS GENÉRICOS (% de resultados positivos) | PRUEBAS CONFIRMATORIAS |
|-----------------------------------|---|-------------------------------|
| Lupus eritematoso sistémico (LES) | 95-100% | AntiDNA nativo, antiSm |
| Esclerosis sistémica | 60-80% | AntiScl 70 |
| Síndrome de Sjögren | 40-70% | AntiSS-A/Ro y anti SS-B/La |

Además, es importante tener en cuenta el título de ANAS; un título mayor a 1:160 es significativo para el diagnóstico de una enfermedad del tejido conectivo. El patrón de fluorescencia nuclear (homogéneo, periférico, moteado, nucleolar y centromérico), que en el pasado tuvo importancia clínica porque cada uno de ellos



se asociaba con la presencia de determinados anticuerpos y con ciertas enfermedades, ha perdido relevancia en la actualidad por la posibilidad de detectar en forma directa los anticuerpos específicos.

II. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar mediante inmunofluorescencia indirecta anticuerpos antinucleares genéricos en suero humano.

Objetivo específico

Conocer la importancia de las enfermedades autoinmunes como un problema de salud pública.

III. MATERIALES Y REACTIVOS

- Kit para determinación de ANAs. Contiene los siguientes componentes:
 - Portaobjetos. Células Hep-2 cultivadas en cada pocillo.
 - PBS (10X).
 - Control positivo ANA- Hep-2. Suero humano con anticuerpos antinucleares. Patrón homogéneo.
 - Control negativo. Suero humano sin anticuerpos antinucleares.
 - IgG FITC/Evans anticuerpos de cabra antiinmunoglobulinas IgG humanas conjugadas con isotiocionato de fluoresceína (FITC), azul de EVANS
 - Medio de montaje. Manitol, Glicerol y Tris
- Micropipetas graduables - Puntas estériles - Microscopio de fluorescencia - Agua destilada estéril- Cámara húmeda- Cubeta de lavado

IV. PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Preparar una dilución 1/10 del PBS con agua destilada

V. MUESTRAS



Suero. Diluir las muestras 1/80 en PBS. Para la titulación de una muestra positiva realizar diluciones dobles en PBS a partir de la 1/160

VI. PROCEDIMIENTO

1. En una lámina de Hep-2 agregar una gota de control positivo, una gota de control negativo y 25 μ l de la muestra diluida.
2. Incubar el portaobjetos en cámara húmeda durante 30 minutos a temperatura ambiente.
3. Eliminar las gotas de las muestras inclinando el portaobjetos y golpeándolo ligeramente. Evitar la mezcla de sueros.
4. Eliminar el suero remanente en el portaobjetos lavándolo con PBS. Utilizar pipetas.
5. Lavar el portaobjetos sumergiéndolo en una cubeta con PBS durante 5 minutos. Cambiar el PBS y repetir el lavado.
6. Secar cuidadosamente el portaobjetos utilizando papel secante. El sustrato debe permanecer siempre húmedo.
7. Depositar una gota del reactivo IgG FITC/Evans en cada pocillo. Colocar el portaobjeto en una cámara húmeda e incubar a temperatura ambiente durante 30 minutos.
8. Lavar y secar como se indica en los pasos 5 y 6
9. Depositar una gota del medio de montaje sobre el portaobjeto y colocar un cubreobjeto procurando evitar la formación de burbujas de aire.
10. Colocar la lámina en el microscopio de fluorescencia y observar la emisión de luz por parte de los fluorocromos presentes en el conjugado.

VII. TALLER PRE LABORATORIO

1. Explique qué es inmunofluorescencia directa e indirecta y dé ejemplos.
2. Explique el fundamento de la técnica IFI para la determinación de ANAS.



3. ¿Qué patrones de fluorescencia se pueden observar en la determinación de anticuerpos antinucleares? Dibuje y explique la importancia clínica.
4. ¿Qué son las células Hep-2?
5. Consulte un caso clínico de una enfermedad autoinmune con anticuerpos antinucleares positivos.



BIBLIOGRAFÍA

1. García E, Caraballo L. Asma. Bogotá: Editorial Médica Panamericana. 2005.
2. Abbott-División diagnóstico. Introducción a los inmuno-ensayos. Abbott Latinoamér. Disponible en http://latinoamerica.abbottdiagnostics.com/ciencia/pdf/1_d.pdf
3. García-Campana AM, Baeyens WRG, Xang X, Alés F, Gamiz L. Quimioluminiscencia: una interesante alternativa para la detección en sistemas de flujo. Ars Pharmaceutica. 2001; 42 (1): 81-107.
4. Castillo Navarrete M. Técnicas inmunológicas. Chile: Centro de Diagnóstico Oncoinmunológico. 2006. Disponible en <http://www.oncoimmun.cl/docencia/inmuno/clase12.pdf>
5. Gongora MA; Sierra JJ; Del Rio BE; Castañón LA. Aproximación práctica al diagnóstico de la alergia alimentaria. Bol Med Hosp Infant Mex. 2010; 67: 390-398.
6. Gobernación de Antioquia. Jornadas de actualización en línea. Medellín: Gobernación de Antioquia. Disponible en <http://www.nacer.udea.edu.co/pdf/jornadas/5respuestasauxiliares.pdf>
7. Conteo celular con hematocito [Technical Note]. Disponible en: <http://www.celeromics.com/es/resources/docs/Articles/Conteo-Camara-Neubauer.pdf>
8. Ovid [Internet]. New York: Ovid Technologies, Inc. c2000 - [citado 2018 Oct 12]. Disponible en: <http://gateway.ovid.com/>.



CORPORACIÓN UNIVERSITARIA RAFAEL NÚÑEZ

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 110



www.curn.edu.co

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