

**CENTRO DE BACHILLERATO TECNOLÓGICO,
industrial y de servicios #130**

Análisis Inmunológicos.

Profesoras: Ing. Elsa Elena Campillo Pedroza y Q.B.P. María Elena Cisneros Robledo.

Cruz Fierro Carlos Francisco.

Especialidad: Técnico Laboratorista Clínico.

Semestre: V.

Agosto - Diciembre 1993.



Inmunología

La palabra inmune proviene del latín *immunis*, es decir, exento de pagos (impuestos); se desconoce el por qué de esta raíz etimológica. La inmunología es la rama de la Biología que se encarga del estudio de la defensa del organismo ante agentes extraños.

Breve Historia

Edward Jenner: Efectuó la primera inmunización (contra la viruela, fue la primera vacuna) alrededor de 1700.

Luis Pasteur: Obtiene la vacuna con microorganismos atenuados contra el cólera avino.

Metchikoff: Descubre la fagocitosis (después llamada respuesta celular).

Pfeiffer: Niega la teoría de Metchikoff, afirmando que la respuesta inmunitaria no está dada por células. Descubre la respuesta humoral (reacciones antígeno-anticuerpo).

Bordet: Descubre el sistema del complemento (llamado por él sensibilizador que produce la respuesta humoral).

Ehrlich: Crea la teoría "llave-cerradura".

Landsteiner: Descubre los sistemas sanguíneos ABO y Rh.

Antígenos Y Anticuerpos

Antígeno: Cualquier sustancia capaz de inducir una reacción contra sí misma.

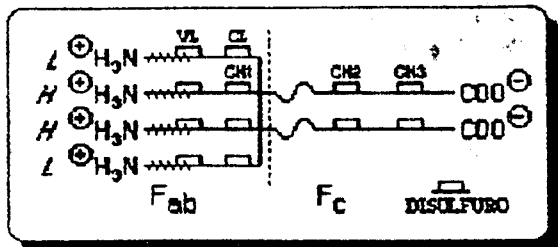
Anticuerpo: Es una sustancia presente en el suero capaz de reaccionar con el antígeno.

Inmunoglobulinas

Son proteínas que tienen actividad de anticuerpo, es decir, la propiedad de combinarse específicamente con la sustancia que provocó su formación. Son glucoproteínas



compuestas en un 82-96% de polipéptidos y de un 4-18% de carbohidratos. Son moléculas bifuncionales ya que se ligan al antígeno y a la vez desencadenan la fijación del complemento.



Las inmunoglobulinas están formadas por dos cadenas ligeras (L) y dos cadenas pesadas (H) y poseen una estructura de tipo bisagra (línea punteada) que permite el movimiento de la molécula para unirse al antígeno o a la célula.

La parte de la izquierda recibe el nombre de "sitio variable (V) de fijación al antígeno" y la de la derecha se denomina "sitio constante (C) de fijación al fagocito o inmunocito". La papaína (enzima principal de la papaya) divide la inmunoglobulina por la unión de bisagra en las fracciones Fab y Fc o porción cristalizante.

Tipos DE INMUNOGLOBULINAS

Immunoglobulina G (IgG): En los adultos normales la IgG humana constituye aproximadamente el 75% del total de las inmunoglobulinas. La IgG es la única inmunoglobulina que puede atravesar la placenta en el humano y es la responsable de la protección del recién nacido durante los primeros meses de vida. Hay varias subclases de IgG llamadas IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4. Los macrófagos portan sobre su superficie receptores que enlazan los fragmentos Fc de las inmunoglobulinas.

Immunoglobulina A (IgA): Es la inmunoglobulina predominante en las secreciones corporales. Proporciona el mecanismo de defensa primaria contra la infección local debido a su abundancia en la saliva, las lágrimas, las secreciones bronquiales, la mucosa nasal, el líquido prostático, las secreciones vaginales. La IgA constituye aproximadamente el 15% de todas las inmunoglobulinas.

Immunoglobulina M (IgM): Constituye aproximadamente el 10% de las inmunoglobulinas normales. Los anticuerpos IgM son predominante en las respuestas inmunitarias iniciales a la mayoría de los antígenos. Es también la inmunoglobulina fijadora del complemento más eficiente.

Immunoglobulina D (IgD): Esta inmunoglobulina está presente de manera normal en cantidades mínimas (0.2%). Es relativamente lábil a la degradación por el calor y las enzimas proteolíticas. La función principal de la IgD no ha sido aún determinada.

Immunoglobulina E (IgE): Comprende sólo 0.004% del total de las inmunoglobulinas pero se liga con gran afinidad con las células cebadas a través de un sitio en la región Fc. Al combinarse con ciertos antígenos específicos llamados alérgenos, la IgE desencadena la liberación, a partir de células cebadas, de mediadores farmacológicos responsables de las ronchas, de la urticaria, provocadas por la exposición de la piel a los alérgenos.



Células Del Sistema Inmunitario

Los macrófagos tienen gran afinidad por participar en la respuesta inmunitaria. Aunque no son específicos para un antígeno determinado, su papel está en la concentración y la presentación de los antígenos a los linfocitos. Al parecer el macrófago es el que determina cuáles células T serán inducidas para ser estimuladas y puestas en función por diversos antígenos. Juega un papel clave en procesamiento del antígeno ya que es la principal célula fagocítica del sistema.

Complemento (C)

Es el mediador humoral primario de las reacciones antígeno-anticuerpo. Consiste de cuando menos 20 proteínas distintas capaces de actuar de manera recíproca unas con otras, con el anticuerpo y con las membranas celulares. Después de la activación de éstos pueden provocar la lisis de varias células, bacterias y virus, hasta mediar en los procesos inflamatorios.

Las proteínas individuales de este sistema se encuentran en circulación como moléculas inactivas, estas moléculas se designan con símbolos numéricos: C1, C2, C3, C4, etcétera, o en el caso de ciertos componentes por símbolos o nombres triviales: properdina, factor D, factor B o factor A. Las enzimas de complemento, formadas durante el proceso se designan por una barra vertical colocada sobre el símbolo del componente: $\overline{C4}$. Los fragmentos de los componentes que se originan a partir del desdoblamiento enzimático son denotados por letras que siguen a la designación empleada por el componente: C4a, C4b.

Hay dos mecanismos o vías para la activación del complemento que son totalmente independiente una de otra. Estos mecanismos se llaman vía clásica y vía alterna o de la properdina.

VÍA CLÁSICA

Puede ser activada por complejos antígeno-anticuerpo o inmunoglobulinas agregadas. Las inmunoglobulinas de la clase IgM y de subclases IgG1, IgG2 e IgG3 son capaces de activar la vía clásica, mientras que la IgA, IgD, IgE y la subclase IgG4 son inactivas.

C1: Se compone de tres moléculas proteicas distintas llamadas C1q, C1r y C1s que son mantenidas unidas por enlaces dependientes del calcio. La molécula de C1q porta los sitios que permiten que la molécula de C1 se fije a la región Fc de la inmunoglobulinas. Después de la fijación de C1 a los activadores de forma [Ac]C1 y C1r adquiere la capacidad para activar enzimáticamente a C1s. El C1s activado activa la enzima $\overline{C4b,2a}$; la cual se forma de los fragmentos más grandes de C4 y C2.

C4: Es desdoblada por $\overline{C1s}$ en dos fragmentos, uno mayor llamado C4b que posee un sitio de fijación que lo capacita para unirse a los activadores.



C2: La ruptura de C2 por C1s también genera un sitio de fijación en el fragmento más grande de C2, llamado C2a, el cual le permite fijarse a C4b. El C4b,2a es una enzima proteolítica que asume el papel de continuar una reacción progresiva del complemento. Desdobla al siguiente componente reaccionante de la serie llamado C3.

C3: El C4b,2a desdobla la molécula de C3 en C3a y C3b, este último tiene un enlace lábil, lo cual le permite insertarse en el complejo enzimático C4b,2a. La enzima C4b,2a,3b es la última enzima de la vía clásica, que activa a C5.

VÍA ALTERNA

Puede ser activada por IgA y por la IgG4; también puede ser iniciada por enzimas semejantes a la tripsina, lipopolisacáridos. Las proteínas que intervienen en la vía alterna son el C3, el factor B y el factor D. Un requerimiento para la activación de la vía alterna es la presencia de C3b, el cual es sin duda generado en cantidades pequeñas en la circulación. Esta ruptura se produce por agua en los enlaces de C3 (C3 activado o C3*), el cual reacciona con los factores B y D para generar una enzima capaz de fragmentar a C3 en C3a y C3b. El C3b se deposita sobre los activadores y ya unido a ellos interactúa con los factores B y D formando una enzima llamada C3b,Bb, ésta se hace más eficaz en presencia de la properdina, la cual se fija al complejo y lo estabiliza formando una enzima C3b,P,Bb que va a desdoblar a C2. C3b,Bb y C3b,P,Bb son capaces de desdoblar a C5 y de iniciar el mecanismo de ataque a la membrana.

REACCIÓN DE C5 A C9

La porción terminal de la serie de factores del complemento es denominado el sistema de ataque a la membrana ya que C5b, C6, C7, C8 y C9 se deben fijar a ella con el fin de que ocurran cambios o daños en la membrana.

El mecanismo de ataque del complemento es iniciado con el desdoblamiento de C5. La reacción de activación da por resultado la generación de un fragmento pequeño llamado C5a y uno mayor C5b que tiene capacidad para unirse a C6 y C7 formando un complejo trimolecular estable llamado C5b,6,7. Este complejo tiene capacidad para unirse a las membranas las cuales poseen un sitio de unión para una molécula de C8. La ruptura de la membrana comienza en esta etapa; sin embargo, el proceso citolítico es fuertemente acelerado con la adhesión de C9.

Reacciones Febriles

AGLUTINACIÓN

Tiene por objeto poner de manifiesto en el suero de enfermos que hayan padecido o padezcan una infección, la presencia de aglutininas (anticuerpos). Tal ocurre en la salmonelosis (fiebre tifoidea, paratífica), fiebre de Malta, tifus exantemático, peste, cólera, etcétera.



Se ha de obtener el suero del enfermo (en donde va el anticuerpo), poniéndolo en contacto con el antígeno (emulsión o suspensión bacteriana). Si el suero contiene aglutininas correspondientes a dicha bacteria, los gérmenes son aglutinados, formando montones o flóculos. Hay que tomar en cuenta que las aglutininas sólo aparecen cuando el organismo ha reaccionado frente al antígeno infectante (aproximadamente 7 días después de la infección)

Los antígenos febriles son suspensiones estables de bacterias muertas, para detectar infecciones febriles.

SALMONELLA

Las salmonelas son bacilos móviles gramnegativos, que producen las fiebres intestinales, por ejemplo, la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*) y paratifoidea (*Salmonella paratyphi*). Los organismos son ingeridos con los alimentos o bebidas contaminadas y alcanzan el intestino delgado, a partir del cual penetran en los linfáticos intestinales. Los microorganismos flagelados *Salmonella typhi* y *Salmonella enteritidis* (o *Salmonella paratyphi*) poseen antígenos somático y/o flagelar y el huésped infectado genera habitualmente anticuerpos contra ambos.

La prueba de Widal es un método de aglutinación, los anticuerpos contra los antígenos "H" forman agregados grandes y groseros, fácilmente dispersados mientras que los anticuerpos "O" forman agregados finamente granulados (se efectúa el cultivo a partir de las heces)

Los títulos de anticuerpos aumentan hasta alcanzar un pico en las siguientes semanas. Las aglutininas "H" persisten a menudo durante años después de la infección. Como las aglutininas "O" persisten únicamente durante pocos meses son más confiables para diagnosticar una infección reciente, que los anticuerpos anti-"H".

Muchas personas mantienen constantemente niveles moderados de aglutininas "H" e incluso "O" como resultado de una vacunación. Pacientes con procesos entéricos febriles de estas causas poseen con frecuencia títulos crecientes de aglutininas "H" y "O". Enfermos con hepatocitopatías y con un aumento generalizado de las inmunoglobulinas tienen de un modo crónico niveles altos. Los drogadictos tienen característicamente mayores niveles de aglutininas para *Salmonella* que lo normal; ello refleja la escasa higiene y el aumento de los contactos con organismos entéricos de todos tipos. De hecho, los títulos de 1:40 o 1:80 en cualquiera de los dos anticuerpos se consideran dentro del espectro normal.

PROTEUS

Son bacilos gramnegativos, móviles y aerobios, las especies móviles de *Proteus* contienen antígeno "H" además del antígeno "O" somático, ciertas cepas denominadas OX poseen polisacáridos específicos comunes con algunas rickettsias; las cepas OX son aglutinadas por sueros de pacientes con enfermedades causadas por rickettsias (reacción Weil Félix).



Las rickettsias son pequeñas bacterias parásitas obligadas. Aunque las rickettsias y los proteus son organismos no relacionados íntimamente, parece que comparten ciertos antígenos en común. Así, durante la evolución de infecciones por rickettsias, los pacientes elaboran anticuerpos que aglutinan determinadas cepas de *Proteus vulgaris*. Por ejemplo, la cepa OX-19 de *Proteus* es fuertemente aglutinada por suero de personas infectadas por tifo epidémico o endémico:

- Tifo epidémico: por picadura de piojo (*R. prowazeki*).
- Tifo endémico: por picadura de pulga marina (*R. moonseri*).

Los máximos títulos se alcanzan en el periodo inicial de convalecencia y en varios meses (8 a 12) los títulos descienden a niveles no detectables.

BRUCELLA ABORTUS

Las brucelas son pequeños cocobacilos gramnegativos y aerobios, inmóviles, no esporulados y con relativa inactividad metabólica. Son parásitos obligados de los animales y del hombre. Las vías comunes de infección en el hombre son el tracto intestinal (ingestión de leche infectada), las mucosas y la piel (contacto con tejidos de animales).

El título inicia su ascenso durante la segunda semana de la enfermedad y generalmente alcanza un máximo entre la tercera y cuarta semana de la infección. un título de 1:320 es común en enfermos en fase activa. Los niveles máximos están entre 1:640 y 1:2560. Después de la recuperación mantienen un título de 1:80 o superiores durante cinco o más años. Los que trabajan con animales pueden presentar títulos de 1:80 sin ningún historial de enfermedad activa.

La aglutinación se reporta semicuantitativamente: 4+ corresponden a una aglutinación completa, 3+ al 75%, 2+ al 50%, y 1+ al 25%. Las diluciones del suero sobre la placa corresponden a:

- 1:20 0.08 ml de suero.
- 1:40 0.04 ml de suero.
- 1:80 0.02 ml de suero.
- 1:160 0.01 ml de suero.
- 1:320 0.005 ml de suero.



Prácticas De Análisis Inmunológicos

Práctica 1

VDRL

Fundamento:

La prueba de VDRL es un procedimiento de floculación no treponémico, usado para detectar anticuerpos en sueros de pacientes con sífilis designados como reaginas. El antígeno no treponémico no es absolutamente específico para sífilis, ni tiene sensibilidad satisfactoria en todas las etapas de la sífilis, pero sustituye con éxito en un 98% de sensibilidad al antígeno treponémico. Cuando los resultados obtenidos por la prueba no treponémica no están de acuerdo con la observación clínica, se debe hacer una prueba de inmunofluorescencia.

Puede haber un falso positivo cuando hay drogas, embarazo, reacciones febriles muy altas o edad muy avanzada; sin embargo, con las respectivas diluciones, se puede comprobar. Cuando hay algún VDRL positivo se le hacen las diluciones para poder estar seguros de que es positivo completamente y no dar un resultado falso al médico.

Material:

- > 2 tubos de ensaye.
- > Gradilla.
- > Placa de anillos para VDRL.
- > Pipetas.
- > Torniquetes.
- > Jeringas.
- > Torundas.
- > Suero.
- > Antígeno para VDRL.
- > Centrifuga.

Diluciones:

- > 1:02 MENOR
- > 1:04 EXACTA



- > 1:08 EXACTA
- > 1:012 MAYOR

Reactivos:

Preparación de los reactivos que contiene el equipo:

El antígeno contiene una mezcla de: cardiolipina 0.03%, colesterol 0.9%, lactina 0.21% \pm 0.01% en etanol absoluto. Estable a temperatura ambiente, cerrado y protegido de la luz.

Solución amortiguadora para VDRL pH 6 \pm 0.1: fosfato de sodio secundario anhidro 0.0037%, Dowicil al 1% 0.1 ml y de cloruro de sodio 1%. Estable a temperatura ambiente, bien cerrado y protegido de la luz.

Cualquier precipitación persistente en el antígeno o la solución amortiguadora a temperatura ambiente es un indicador de evaporación o contaminación y debe descartarse.

Preparación De Muestras:

1. Tomar de 3 a 5 ml de sangre del paciente y dejarla coagular, centrifugar y separar el suero, que debe ser amarillento y transparente.
2. Calentar el suero en baño de agua a 56°C por 30 minutos. Examinar los sueros al retirarlos del baño, no deben contener partículas, en caso afirmativo, volver a centrifugar.
3. Antes de probar los sueros deben dejarse reposar para que tomen la temperatura ambiente (la reactividad de la prueba aumenta o disminuye con la temperatura).
4. Calentar a 58°C por 10 minutos los sueros que se vayan a probar si han pasado 4 horas de periodo original de calentamiento.

Preparación Del Antígeno:

1. Pipetear 0.4 ml de solución amortiguadora diluyente pH 6 \pm 0.1 al fondo plano de un frasco de 30 ml de capacidad.
2. Agregar 0.5 ml de antígeno (medidos usando la parte terminal de una pipeta graduada de 1.0 ml) directamente sobre la solución amortiguadora, mientras se rota el frasco en una superficie plana, evitando salpicar con la solución la punta de la pipeta que contiene el antígeno. El antígeno se agrega con la pipeta vertical sin introducirla a más de una tercera parte superior de profundidad del frasco. Se adiciona gota a gota pero rápidamente de modo que los 0.5 ml de antígeno se lleven a caer aproximadamente en 10 segundos. La velocidad de rotación del frasco se alcanza cuando el centro del frasco circunscribe un círculo de 5 cm de diámetro aproximadamente 3 veces por segundo.
3. Soplar la última gota de antígeno de la pipeta sin salpicar la solución amortiguadora al frasco al tocarlo con la punta de la pipeta.
4. Continuar la rotación del frasco por 10 segundos.
5. Añadir 4.1 ml de solución amortiguadora con una pipeta de 5 ml.



6. Tapar el frasco y agitar por inversión (la emulsión debe chocar con el tapón y el fondo del frasco) a una velocidad de aproximadamente 30 veces en 10 segundos.
7. Vaciar el antígeno a una jeringa de 1 a 5 ml de capacidad.

El antígeno así preparado debe usarse únicamente durante las siguientes 24 horas.

Procedimiento:

1. Antes de usar la suspensión de antígeno debe probarse su reactividad con sueros control de reactividad conocida: positivo, positivo débil y negativo. Los sueros negativos deben mostrar una completa dispersión de las partículas del antígeno, no debe haber grumos. No usar una suspensión antigénica de reactividad insatisfactoria ni usar mezclas de suspensiones antigénicas de diferentes reactividades.
2. Pipetear 0.05 ml de cada suero precalentado y puesto a temperatura ambiente en cada anillo de cerámica rayado con lápiz graso. El suero debe extenderse libremente en la superficie del anillo, en caso de no ser así debe cambiarse la laminilla porque está sucia.
3. Agregar una gota (1/60 ml) de la suspensión antigénica en cada anillo con suero, con una jeringa y aguja previamente calibrada.
4. Agitar las laminillas por 4 minutos en el agitador mecánico a 180 rpm.
5. Leer al microscopio con ocular 10x y objetivo 10x, inmediatamente después de la agitación. Reportar los resultados.

Resultados:

Si aparecen grumos medianos y grandes se reporta como positivo (P). Si hay grumos pequeños se reporta como positivo débil (PD). Sin grumo o con ligera aspereza es negativo (N).

Ocasionalmente aparecen reacciones de prozona en las que se observa un suero positivo débil o negativo rugoso atípico. Esta reacción ocurre cuando hay un exceso de reagina y se presenta una inhibición parcial o total de reactividad con suero sin diluir, en este caso se obtiene un máximo de reactividad diluyendo el suero. Se recomienda hacer la prueba cuantitativa a todos los sueros positivos, positivos débiles o negativos rugosos, estos dos últimos para descartar el fenómeno de prozona. El suero se diluye con solución salina en diluciones sucesivas (1:2, 1:4, 1:8, 1:16 y 1:32).



Práctica 2

PRUEBA DE EMBARAZO

Procedimiento:

1. Colocar el portaobjetos sobre una superficie horizontal.
2. Agitar suavemente el reactivo de látex para obtener una suspensión homogénea (no es necesario llevar al reactivo a temperatura ambiente antes del uso).
3. Aspirar con una pipeta y una cápsula para succionar la cantidad suficiente de reactivo de látex y transferir una gota cayendo libremente (25µl) sobre el área de prueba del portaobjetos.
4. Devolver al vial el reactivo de látex restante de la pipeta.
5. Utilizando la misma pipeta, aspirar lentamente la muestra de orina y transferir dos gotas, cayendo libremente (50µl), a la misma área de prueba. Desechar la pipeta con la orina restante.
6. Mezclar con una espátula el reactivo de látex y la orina y esparcir la muestra sobre toda el área de prueba. Tirar la espátula.
7. Balancear suavemente el portaobjetos dejando que el líquido fluya lentamente dentro del círculo de prueba durante hasta 2 minutos.
8. Colocar el portaobjetos sobre una superficie horizontal bien iluminada para la lectura del resultado.

Resultados:

Una reacción positiva viene indicada por la producción de una aglutinación del látex granulosa y roja, en el plazo de dos minutos. Una reacción negativa se corresponde al mantenimiento de una suspensión de látex uniforme y roja, al término del periodo de dos minutos.

En el caso de muestras de orina conteniendo concentraciones elevadas de Hormona Gonadotropina Coriónica (hCG), la aglutinación ocurrirá en el plazo de un minuto y por lo tanto no es necesario continuar el balanceo hasta el final del periodo de dos minutos. En el caso de muestras de orina conteniendo concentraciones bajas de hCG, o en el caso de orinas negativas, el balanceo debe continuarse durante y hasta dos minutos.



Práctica 3

REACCIONES FEBRILES

Material:

- Placa con anillos
- Equipo de punción (torniquete, jeringas de 5 ó 10 ml, torundas)
- Tubos de ensaye
- Pipetas de 0.2 y 2 ml
- Pipetas Pasteur y chupón
- Centrifuga

Antígenos Para Las Reacciones Febriles:

- Tífico "O"
- Tífico "H"
- Paratífico "A"
- Paratífico "B"
- Brucella abortus
- Proteus OX-19

Procedimiento:

1. Separar el suero del paciente procurando que no esté hemolizado. Los antígenos y el suero del paciente deberán estar a temperatura ambiente.
2. La solución amortiguadora se prepara diluyendo el amortiguador concentrado, colocando 0.1 ml de amortiguador concentrado y 1.9 ml de agua destilada (la dilución será 1/20).
3. Se empieza con una dilución 1/20, colocando 0.08 ml de suero del paciente en cada anillo de la placa y una gota de antígeno. Mezclar con un aplicador y balancear suavemente la placa.
4. Cuando una reacción sale positiva se hacen las siguientes diluciones y se les coloca una gota del antígeno que haya salido positivo:

SUERO PROBLEMA	ANTIGENO	DILUCION SERA
0.08 ml	1 gota	1/20
0.04 ml	1 gota	1/40
0.02 ml	1 gota	1/80
0.01 ml	1 gota	1/160
0.005 ml	1 gota	1/320



5. Si aún sale positivo, se realiza una dilución del suero problema, colocando 0.1 ml de éste con 1.9 ml de agua bidestilada. Nuevamente se realizan las diluciones anteriores, el resultado será:

SUERO PROBLEMA	ANTIGENO	LA DILUCIÓN SERA
0.08 ml	1 gota	1/200
0.04 ml	1 gota	1/400
0.02 ml	1 gota	1/800
0.01 ml	1 gota	1/1600

Los resultados se pueden leer macroscópicamente, pero es preferible leerlos al microscopio con el objetivo 10x.

Práctica 4

PROTEÍNA "C" REACTIVA

Introducción:

La proteína C reactiva (PCR) se detectó por primera vez en 1930 como constituyente del suero de los pacientes con neumonía aguda que formaban una reacción de precipitina mucopocordia "C" de ciertos grupos de neumónicos.

Esta sustancia también produce la hinchazón capsular cuando se mezcla con organismos enteros. La PCR aparece en los primeros días, alcanza su máximo en los primeros días y decrece a niveles no detectables en 8 a 10 días, desde su primera descripción relacionada con la neumonía, se ha detectado en una amplia infinidad de enfermedades infecciosas causadas por bacterias gram positivas y gram negativas, así como en diversas enfermedades inflamatorias no infecciosas; ello aparta la PCR de la categoría de anticuerpos y es clasificada en la actualidad como un reactivo de fase aguda. Un estudio reciente sugiere que la PCR aumenta la fagocitosis de las bacterias. Los individuos incapaces de preparar una proteína pueden ser más susceptibles a las infecciones bacterianas.

Material:

- > Pipetas Pasteur.
- > Pipetas graduadas de 0.2 y 2 ml.
- > Tubos de ensayo.
- > Placa con anillos.
- > Gradilla.
- > Torundas, torniquete y jeringa.
- > Centrifuga.



Procedimiento:

1. Después de tomada la muestra se deja coagular, se separa el coágulo y se centrifuga a 2,500 rpm.
2. Se separa el suero con la pipeta Pasteur y se pasa a otro tubo de ensaye.
3. La solución amortiguadora se prepara diluyendo 0.1 ml de amortiguador concentrado y 1.9 ml de agua destilada.
4. Se diluye el suero del paciente colocando 0.1 ml de suero problema con 1.9 ml de la solución de trabajo preparada en el paso anterior.
5. Colocar una gota de esta dilución en el anillo de la placa marcado como problema. Colocar una gota de suero control positivo y una de suero control negativo en los anillos marcados de la placa.
6. Agitar con suavidad el reactivo de látex para homogeneizarlo. Colocar una gota en cada uno de los anillos de la placa.
7. Mezclar cada anillo con un aplicador distinto. Balancear suavemente la placa.
8. Comparar el problema con los controles positivos y negativo para establecer el resultado de la prueba.

Resultados:

Una reacción positiva se presenta por la aglutinación en el anillo del problema, quedando de aspecto similar al del control positivo. Una reacción negativa aparece cuando no se presenta aglutinación en el anillo del problema, quedando como el control negativo.

Práctica 5

ANTIESTREPTOLISINAS

Objetivo:

Al término de esta práctica, el alumno habrá aprendido las bases teóricas y prácticas para la cuantificación de antiestreptolisinas en suero.

Introducción:

Las antiestreptolisinas son anticuerpos con acción específica contra las estreptolisinas, hemolisinas formadas por el estreptococo, principalmente el β -hemolítico. Para la cuantificación de antiestreptolisina sérica se realiza una serie de diluciones del suero problema con la solución amortiguadora (buffer) apropiado. Luego, estas diluciones se mezclan con estreptolisina. En las diluciones bajas, las concentraciones de antiestreptolisina del suero problema son suficientes para reaccionar con la estreptolisina, por lo que no se presenta hemólisis



alguna y, tras un centrifugado, los eritrocitos se observan intactos. En las diluciones altas y en los resultados de título bajo, la antiestreptolisina sérica ha sido tan diluida que no es suficiente para combinarse con la estreptolisina. Esta estreptolisina libre actúa sobre los glóbulos rojos y los hemolisa. Entonces, aun después de centrifugar, se observa una suspensión homogénea roja.

Material:

- > 6 tubos de ensaye 13×100.
- > Pipetas de 0.5, 1 y 5 ml.
- > Centrifuga.

Reactivos Y Material Biológico:

- > Suero problema.
- > Buffer para antiestreptolisinas.
- > Estreptolisina.
- > Suspensión de glóbulos rojos al 5%.

Preparación De La Suspensión De Glóbulos Rojos:

1. Colocar aproximadamente 3 ml de una muestra de sangre tipo O en un tubo de ensaye y centrifugar 5 minutos a 2 000 rpm.
2. Separar el plasma y desecharlo. Añadir aproximadamente 5 ml de solución salina fisiológica y resuspender el sedimento. Volver a centrifugar.
3. Descartar el sobrenadante de solución salina y repetir este lavado hasta completar tres veces.
4. Eliminar la mayor cantidad posible de solución salina y tomar 1 ml del sedimento eritrocitario y añadirlo a un tubo con 19 ml de buffer para antiestreptolisinas.
5. Homogenizar esta suspensión.

Cuantificación De Antiestreptolisina Sérica:

1. Realizar una dilución 1:50 del suero, colocando 0.1 ml de éste con 4.9 ml de solución amortiguadora.
2. Tomar 5 tubos de ensayo y numerarlos del 1 al 5.
3. Colocar 0.6 ml de buffer en el tubo marcado como 1 y 0.5 ml en cada uno de los tubos restantes.
4. Añadir 0.4 ml de suero diluido al tubo 1. Mezclar perfectamente.
5. Tomar 0.5 ml de la mezcla del tubo 1 y pasarlos al tubo 2. Mezclar el contenido del tubo 2 y de éste tomar 0.5 ml para pasarlos al tubo 3. Continuar con diluciones así y los 0.5 ml finales del tubo 5 desecharlos. Así, cada tubo contendrá 0.5 ml de diluciones sucesivas con factor 2.
6. Añadir 0.25 ml de estreptolisina a cada uno de los tubos.



7. Incubar 15 minutos a 37°C.
8. Añadir 0.25 ml de suspensión de glóbulos rojos al 9% a cada uno de los tubos.
9. Incubar 45 minutos a 37°C, agitando cada 15 minutos.
10. Centrifugar durante un minuto a 1 500 rpm.

Práctica 6

CÉLULAS L.E. (LUPUS ERITEMATOSO)

Objetivo:

Al término de esta práctica, el alumno habrá aprendido las bases teóricas y prácticas para la realización de la prueba de células del lupus eritematoso.

Introducción:

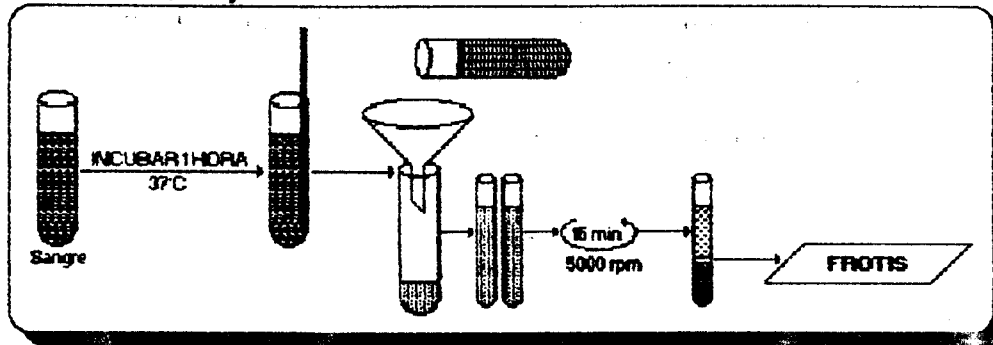
Una sustancia presente en la fracción gammaglobulínica del plasma o del suero en pacientes con lupus eritematoso diseminado, el llamado factor LE, reacciona con la nucleoproteína y con los núcleos de los leucocitos. El factor LE parece ser un anticuerpo. La nucleoproteína transformada adquiere propiedades quimiotácticas y atrae a los fagocitos, generalmente granulocitos, neutrófilos segmentados y a veces monocitos. Rara vez se observa que otros leucocitos actúen como fagocitos. Éstos, con el material nuclear ingerido, constituyen células LE. El fenómeno, en su formación requiere la presencia en el suero del factor LE, de leucocitos lesionados y de leucocitos activos normales.

Morfología: La célula LE contiene dos núcleos. El del fagocito es aplanado y se encuentra en la periferia de la célula, con una cromatina de estructura bien conservada. La mayor parte de la fracción citoplásmica de la célula está ocupada por la masa nuclear transformada e ingerida; el citoplasma forma un estrecho margen en la periferia de la célula LE plenamente desarrollada, falta la estructura normal de cromatina del núcleo ingerido y en su lugar hay una masa redonda, amorfa homogénea y de color púrpura, que varía de tamaño, pero que suele ser más grande que los eritrocitos.

Un fagocito puede englobar más de un núcleo. Es posible que en algunos casos los múltiples núcleos sean segmentados de un granulocito que todavía no se han unido. La transformación del núcleo, es un proceso progresivo y las fases pueden seguirse paso a paso. La acción quimiotáctica precoz del núcleo en transformación o transformado, puede atraer varios granulocitos neutrófilos, que lo rodean formando la llamada roseta.



Diagrama De Flujo:



Material:

- > Tubos de ensayo 13×100.
- > Tubos de Wintrobe.
- > Pipetas Pasteur.
- > Centrifuga.
- > Microscopio
- > Embudo y gasas.
- > Baño María.

Procedimiento:

1. Extraer 5 ml de sangre y colocarla en un tubo sin anticoagulante.
2. Incubar la sangre durante una hora a 37°C.
3. Remover el coágulo y vaciar todo el contenido del tubo en un embudo con gasa para obtener un filtrado.
4. Con el filtrado llenar dos tubos de Wintrobe y centrifugar durante 15 minutos a 5000 rpm.
5. Obtener la capa leucocitaria y depositarla en un portaobjetos. Realizar un frotis.
6. Tefir con la técnica de Wright.
7. Observar al microscopio con objetivo de 100x.



Práctica 7

GRUPOS SANGUÍNEOS

Objetivo:

Al término de esta práctica, el alumno habrá aprendido las bases teóricas y prácticas para la determinación del grupo sanguíneo (sistema ABO) y del factor Rh.

Introducción:

Los grupos sanguíneos del sistema ABO está determinados por los azúcares de la membrana celular del eritrocito, como se muestra en la figura siguiente:

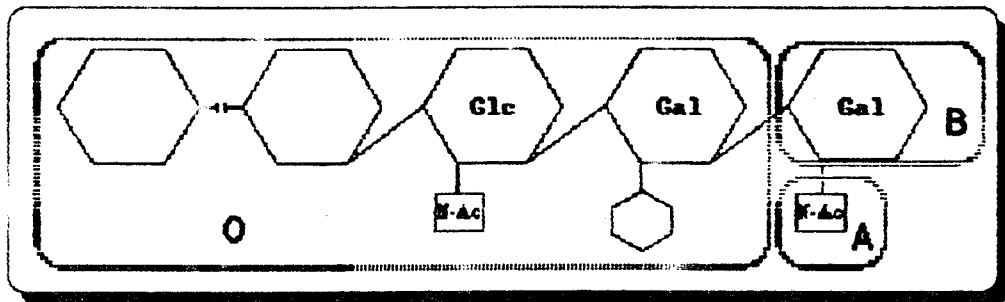
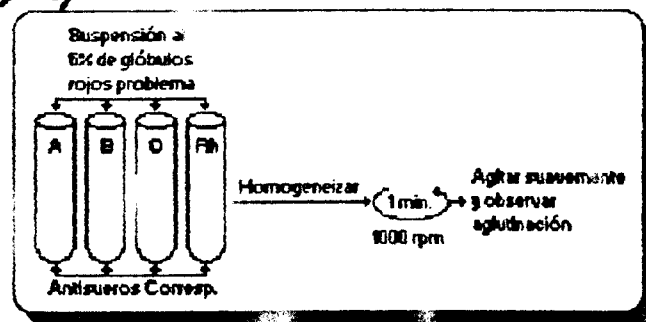


Diagrama De Flujo:



Material:

- Tubos de ensaye 13×100 y 10×75.
- Pipetas de 1 y 10 ml.
- Pipetas Pasteur.
- Centrifuga.



Reactivos Y Material Biológico:

- Sangre problema con anticoagulante.
- Solución salina isotónica.
- Antisueros para grupos sanguíneos.

Procedimiento:

1. Extraer 3 ml de sangre y colocarlos en un frasco con anticoagulante.
2. Marcar cuatro tubos con las letras A, B, AB y Rh.
3. Preparar una suspensión al 5% de glóbulos rojos.
4. Colocar una gota de sangre en cada uno de los tubos marcados.
5. Agregarle los antisueros correspondientes. Homogeneizar.
6. Centrifugar un minuto a 1000 rpm.
7. Agitar suavemente y observar aglutinación.

Práctica 8

FACTOR REUMATOIDE

Objetivo:

Al término de esta práctica el alumno habrá realizado la determinación y cuantificación de factor reumatoide en suero sanguíneo.

Fundamento:

Es una reacción inmunológica entre el látex sensibilizado con gamaglobulina humana y suero del paciente.

Material:

- Equipo de venopunción (jeringa, aguja, torundas alcoholadas, torniquete)
- Pipetas de 1 y 2 ml.
- Tubos de ensaye 13×100.
- Centrifuga.

Procedimiento:

1. Preparar una dilución 1:20 del suero problema, diluyendo 0.1 ml de suero con 1.9 ml de solución amortiguadora.



2. Poner una gota del suero diluido, agregarle una gota de látex hasta tener una suspensión homogénea, mezclar y mover la laminilla por dos minutos.
3. Observar inmediatamente la aglutinación utilizando una fuente de luz directa.

Interpretación:

La aglutinación de las partículas de latex indica una reacción positiva. La no aglutinación o una ligera aparición de granulosidad indica un resultado negativo.

Método Cuantitativo:

1. Preparar una serie de diluciones usando como factor 2, tomando en cuenta que se debe partir del suero diluido 1:20.
2. En una serie de tubos colocar 0.5 ml de solución amortiguadora. De la dilución 1:20 tomar 0.5 ml y colocarlos en uno de los tubos con 0.5 de solución amortiguadora, esto haría una dilución 1:40. Realizar las diluciones hasta la dilución que se juzgue conveniente.
3. Colocar una gota de las diluciones en una placa y agregarle a cada una una gota de látex, mezclar y mover la laminilla por dos minutos.
4. Observar la reacción.

