



Universidad
Continental

Inmunología Especial

Guías de Laboratorio



Visión

Ser una de las 10 mejores universidades privadas del Perú al año 2020, reconocidos por nuestra excelencia académica y vocación de servicio, líderes en formación integral, con perspectiva global; promoviendo la competitividad del país.

Misión

Somos una universidad privada, innovadora y comprometida con el desarrollo del Perú, que se dedica a formar personas competentes, íntegras y emprendedoras, con visión internacional; para que se conviertan en ciudadanos responsables e impulsen el desarrollo de sus comunidades, impartiendo experiencias de aprendizaje vivificantes e inspiradoras; y generando una alta valoración mutua entre todos los grupos de interés.

Universidad Continental

Material publicado con fines de estudio

AMUC00081



Índice

Visión.....	2
Misión.....	2
Índice.....	3
Guía de práctica N° 01:	5
INSTRUMENTACIÓN EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA.....	5
Guía de práctica N° 02:	9
PROCESO DE INMUNIZACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.....	9
Guía de práctica N° 03:	17
PROCESO DE INMUNIZACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN ACTIVANDO RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR.....	17
Guía de práctica N° 04:	24
PROCESO DE INMUNIZACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN ACTIVANDO RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR.....	24
Guía de práctica N° 05:	31
EVALUACIÓN DE INMUNIZACIÓN MEDIANTE TITULACIÓN DE ANTICUERPOS	31
Guía de práctica N° 06:	36
DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE FIEBRE TIFOIDEA, SÍFILIS Y BRUCELOSIS	36
Guía de práctica N° 07:	42
TURBIDIMETRIA, NEFELOMETRÍA, AGLUTINACIÓN EN LATEX DE PROTEÍNAS ESPECIALES	42
Guía de práctica N° 08:	48
AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T. y B. EN DONANTES CADAVERICO EN COBAYOS Y PRUEBA SEROLOGICA HLA CLASE I Y CLASE II.	48
Guía de práctica N° 09:	51
INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA).....	51
Guía de práctica N° 10:	56
ENZIMOINMUNO ANÁLISIS (ELISA).....	56
Guía de práctica N° 11:	61
ANÁLISIS DE MULTIPLICACIÓN ENZIMÁTICA (EMIT).....	61
Guía de práctica N° 12:	65
DIAGNOSTICO MARCADORES INFECCIOSOS HEPATITIS B Y C.....	65
Guía de práctica N° 13:	69
QUIMIOLUMINISCENCIA PARA MARCADORES TUMORALES Y HORMONAS	69



Guía de práctica N° 14:	73
EXTRACCIÓN DE ADN	73
Guía de práctica N° 15:	77
TALLER DE MANEJO DE EQUIPOS DE ALTA TECNOLOGÍA	77
Guía de práctica N° 16:	80
TALLER DE MANEJO DE EQUIPOS DE ALTA TECNOLOGIA	80



Guía de práctica N° 01:

INSTRUMENTACIÓN EN EL LABORATORIO DE INMUNOLOGÍA

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hijar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Instrumentación en el Laboratorio de Inmunología Especial

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Identificar las características de diseño, función y utilidad de cada instrumento, Equipo y materiales utilizados en el laboratorio de Inmunología especial en el hospital Nacional Ramiro Priale Priale EsSalud Huancayo.

3. Equipos y materiales a utilizar:

A. Biológico

- Especímenes biológicos diversos utilizados en el laboratorio de inmunología Especial.
- Animales de Experimentación.

B. De Laboratorio

- Equipos de Laboratorio
- Instrumentos más utilizados en Laboratorio
- Materiales de Laboratorio



- Insumos
- Reactivos
- Manuales de procedimientos técnico
- Poes

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. Procedimiento experimental :

Presentación y exposición de cada uno de los equipos , instrumentos y materiales utilizados en un laboratorio de inmunología especial, detallar , arquitectura, diseño, describir sus partes, software y usos aplicaciones de los instrumentos para desarrollar la diferentes tecnologías.

Es muy importante que los materiales y equipos de uso común en el laboratorio se identifiquen por su nombre correcto y uso específico que tiene cada uno, pero más importante es saber manejarlo correctamente en el momento oportuno, teniendo en cuenta los cuidados y normas especiales para el uso de aquellos que así lo requieran. Los instrumentos y útiles de laboratorio están constituidos de materiales diversos y se clasifican de la siguiente manera: Material de laboratorio • Vidrio • Porcelana. • Plástico. • Metal. • Madera, goma y papel.

1. MATERIAL DE VIDRIO El instrumental de vidrio usado para realizar investigaciones o reacciones químicas debe ser fabricado con materiales resistentes a la acción de los agentes químicos. El vidrio corriente no sirve para la fabricación de instrumentos de laboratorio por ser muy frágil y vulnerable a los agentes químicos y físicos. Por tal razón se construyen de cristal de vidrio, pudiendo ser este de vidrio grueso o delgado. Los instrumentos construidos con vidrio grueso solo son apropiados para contener y trasvasar (ver tabla N°



2) o medir (ver tabla N° 3) si se intenta calentarlos se puede romper con mucha facilidad. Ej: embudos, cilindros graduados, medidas cónicas y agitadores. Los instrumentos contruidos con vidrio delgado son muy resistentes al calor, pero solo cuando son calentados gradualmente y enfriados de la misma manera; por eso se recomienda interponer una rejilla metálica entre el fondo del recipiente y el mechero cuando va a realizarse un calentamiento del instrumento (entre estos están el Pyrex, vycor, kimble etc). Ej: Balones, matraces, vasos de precipitado, tubos de ensayo, etc. Los instrumentos volumétricos de vidrio delgado se caracterizan por su gran precisión a diferencia de los de vidrio grueso que es menos preciso. A continuación se describen alguno de los instrumentos de uso rutinario fabricados con vidrio. Existen otros materiales de vidrio de suma importancia dentro de un laboratorio como son: embudos, vidrio reloj, tubos conectores, tubos refrigerantes etc.

3. MATERIAL DE PLASTICO Así como los materiales se fabrican de vidrio y porcelana también se encuentran de plástico elaborados con polímeros resistentes a ácidos, solventes orgánicos e hidróxidos. En la tabla N° 6 se describen los diferentes materiales de plástico de uso frecuente en el laboratorio.

4.- Microscopio de Campo oscuro invertido

5.- Analizador Inmunológico Automatizado.

6.- Analizador Automatizado de Drogas inmunosupresoras.

7.- Analizador Termociclador.

8.- Analizador de Turbidimetria.

9.- Microscopio Eléctrico Binocular.

10.- estufa o incubadora de calor seco. .

Metodología.

Cada estudiante se hace responsable de un equipo, instrumento o material asignado lo presenta describe sus características.

Luego el docente completa toda la información y detalles bondades de usos



y aplicaciones de los mismos para lograr el propósito del conocimiento de la instrumentación.

6. Resultados

Los resultados es tomar nota de las características de cada material presentado, dibujar, fotografiar y/o revisar los manuales técnico operativos. Y manual del operador.

7. Conclusiones

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: 2007. Inmunología de Kuby. Ed. McGraw-Hill. México. Sexta edición. ISBN 13: 978-970-10-645
- ISO15189:2007. Laboratorios clínicos — Requisitos particulares para la calidad y la competencia. Organización Internacional de Normalización. 2007. Actualmente en revisión. 8. Guide for National Public Health Laboratory Networking to Strengthen Integrated Disease Surveillance and Response (IDSR). Organización Mundial de la Salud. 2008.
- <http://www.afro.who.int/en/clusters-a-programmes/hss/blood-safety-laboratories-a-health-technology/htmlpublications.html>, último acceso el 5 de octubre de 2012. 9. Asia Pacific Strategy for Strengthening Health Laboratorio Services (2010-2015). Organización Mundial de la Salud. 2010.



Guía de práctica N° 02:

PROCESO DE INMUNIZACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Manejo de Animales de experimentación: (conejo, cobayo, ratón albino y cuy)

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

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

3. Equipos y materiales a utilizar:

C. Biológico

- Conejo macho adulto de la raza Nueva Zelanda
- Cuy Andino de tamaño mediano
- Ratón albino
- Hámster y/o cobayo

D. Médico clínico

- Sujetadores
- Mesas de superficies lisa
- Torundas de algodón
- Alcohol al 70% o 96%
- Xilol

E. De campo

- Alimento comercial para conejos en etapa adulta



- Jaulas metálicas
- Alimento para animales de experimentación

F. De Laboratorio

- Frascos de vidrio
- Refrigerador
- Centrifuga clínica a 5000 RPM
- Jeringa hipodérmica tuberculina

4. Notas de seguridad:

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

5. Procedimiento experimental:

El conejo es un mamífero roedor que en libertad se alimenta exclusivamente de hierbas y granos, su cuerpo está cubierto por un pelo espeso y suave, tienen un temperamento asustadizo, propensos al pánico, por eso su trato y transporte debe ser cuidadoso. Cuando se encuentran nerviosos pueden arañar con los miembros posteriores, excepcionalmente, llegan a morder. Cuando se aloja a varios machos juntos en un periodo prolongado, por instinto tienden a pelearse por una jerarquía.

Los conejos pueden ser empleados para muchos propósitos, entre ellos: - Para sangrado o inyecciones endovenosas se prefiere razas de orejas grandes; - En la determinación de pirógenos de preparados farmacéuticos; - En la preparación de antisueros; - Para pruebas de toxicidad de drogas y productos biológicos; - Pruebas rutinarias de diagnóstico; - Prueba de irritantes cutáneos y oculares, debido a su alta sensibilidad para estos productos; - En la investigación de cirugía cardiovascular y estudios de hipertensión, enfermedades infecciosas, teratología, arteriosclerosis y serología; - El conejo



es apropiado para estudios sobre reproducción, puesto que la ovulación no es espontánea, no hay anestro estacional, la gestación es corta y el semen se puede recolectar fácilmente. Se usan para el estudio de anticonceptivos orales; - En investigación de enfermedades infecciosas e inmunológicas, por la alta y calidad y cantidad de sus anticuerpos; - También se usan en serología y para screening de agentes embriológicos y teratogénicos; - Entre otras aplicaciones también son usados para cría de moscas tsé- tsé; - También se utiliza con fines pedagógicos para anatomía, fisiología experimental, nutrición, reproducción, embriología, etc. CENTRO NACIONAL DE PRODUCTOS BIOLÓGICOS / INS 10 Es preferible utilizar razas medianas, ya que las pequeñas tienen orejas extremadamente cortas y las inoculaciones se hacen dificultosas. Por otro lado, las razas muy grandes son difíciles de manipular, además de ocupar cajas más grandes y consumir más alimentos.

6.- MANEJO DIARIO

Alimentación

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

Agua

Diariamente, los animales deben tener acceso a agua potable no contaminada y de acuerdo a sus necesidades particulares. La calidad y definición de agua potable puede variar según la localidad (Homburger y otros 1993). Puede ser necesaria la determinación periódica del pH, dureza y contaminación química y microbiológica para asegurar que la calidad del agua es aceptable, especialmente si los componentes normales del agua de una localidad dada pueden influir en los resultados del estudio en que se use



esa agua. Cuando los protocolos experimentales requieren agua altamente pura, se le puede tratar o purificar para eliminar o reducir al mínimo la contaminación. Se debe considerar cuidadosamente la selección del tratamiento del agua porque muchas de ellas tienen el potencial de causar alteraciones fisiológicas, cambiar la microflora o alterar los resultados experimentales (Fidler 1977; Hall y otros 1980; Hermann y otros 1982; Homberger y otros 1993). Por ejemplo, la clorinación del agua suministrada puede ser útil para algunas especies, pero tóxico para otras (ej. animales acuáticos). Los utensilios para dar de beber, tales como las pipetas de los bebederos y las válvulas automáticas, se deben revisar diariamente para verificar un adecuado mantenimiento, limpieza y operación. En ocasiones, los animales tienen que ser entrenados a utilizar los componentes de los sistemas de provisión automática. Es mejor cambiar bebederos que rellenarlos, debido a la potencial contaminación microbiológica cruzada; pero en caso de rellenar bebederos se debe tener cuidado de regresarlos a la misma jaula de donde fueron tomados. Los animales alojados al aire libre podrían tener acceso a otra agua que no sea la suministrada deliberadamente, como por ejemplo la de arroyuelos o charcos formados por

Técnica

- 1.- se toma a cada uno de los animales para su demostración explicando el correcto manejo y transporte de los conejos
- 2.- se presenta al ratón albino para su conocimiento y manejo de los mismos para cada propósito de uso en el laboratorio
- 3.- se toma y se presenta al Hamster en el manejo y desplazamiento para cada fin del manipuleo del animal de experimentación.
- 4.- se presenta al cobayo o cuy para demostrar su manejo y cuidado toda vez que el animal se utilizara para extracción del bazo y ganglios periféricos.
- 5.- se recomienda los cuidados de cada animal durante su manejo y uso en el laboratorio de inmunología Especial.



Conejos albinos raza New Zelanda



Ratones albinos



Cuyo o cobayos raza mestiza



hámster

**a. RECOMENDACIONES PARA EL CUIDADO DEL ANIMAL.**

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

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

CUADRO 2.2
ESPACIO RECOMENDADO PARA CONEJOS, GATOS,
PERROS, PRIMATES Y AVES

ANIMAL	PESO Kg.	ÁREA DE PISO/ANIMAL m ²	ALTURA cm ² .
Conejos	menos de 2	0.14	35.6
	hasta 4	0.27	35.6
	hasta 5.4	0.36	35.6
	más de 5.4	0.45 o más	35.6
Gatos	menos o igual a 4	0.27	61.0
	más de 4	0.36 o más	61.0
Perros (1)	menos de 15	0.72	-
	hasta 30	1.08	-
	más de 30	o más	-
Palomas (2)	-	0.072	-
Codornices (2)	-	0.022	-
Gallinas (2)	menos de 0.25	0.022	-
	hasta 0.5	0.045	-
	hasta 1.5	0.09	-
	hasta 3.0	0.18	-
	más de 3.0	0.27 o más	-

(1) Estas recomendaciones pueden requerir modificaciones debido a la conformación corporal de los animales. Se recomienda que la altura de la jaula permita al animal permanecer en una posición cómoda y que el área mínima del piso sea igual al cuadrado de la suma de la longitud del perro en metros (de la punta de la nariz a la base de la cola) más 0.15 m.

(2) La altura de la jaula debe ser suficiente para permitir al animal permanecer erecto con sus patas sobre el piso.



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

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

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

6. Resultados

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

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

7. Conclusiones



8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- In veterinary technology: AVMA, Membership Directory and Resource Manual, 44th ed. Schaumburg, Ill.: AVMA; 1995. p.236-240
- Tur-Mari JA, Orellana-Muriana JM (editors). Animal research and welfare: a partnership. FELASA-ICLAS Joint Meetitn, 7th symposium, Palma de Mallorca 26-28 May 1999. London: Laboratory Animal Ltd; 2000. Ü
- Centro Panamericano de Fiebre Aftosa. Temas seleccionados sobre medicina de animales de laboratorio: El ratón. Río de Janeiro: Centro Panamericano de Fiebre Aftosa; 1988. Serie de Monografías Científicas y Técnicas N.º 3. Disponible en: <http://bvs.panaftosa.org.br/textoc/SerMonCienTec3.pdf>.
- Office of the Federal Register National and Records Administration. Code of Federal Regulations. Title 9, Animals and Animal Products. Washington DC: US Government Printing Office; 1992. Ü



Guía de práctica N° 03:

**PROCESO DE INMUNIZACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN
ACTIVANDO RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR**

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Híjar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Proceso de inmunización en animales de experimentación activando respuesta inmune humoral y celular Segunda semana

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Discrimina el comportamiento de los antígenos mediante un proceso de inmunización en animales de experimentación. Observar cambios fisiológicos En el animal de experimentación.

3. Equipos y materiales a utilizar:

G. Biológico

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

H. Médico clínico

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

I. De campo

- Alimento comercial para conejos en etapa adulta
- Jaulas metálicas



J. De Laboratorio

- Congelador -20 °C
- Refrigerador
- Centrifuga clínica a 5000 RPM
- Luz para aglutinaciones
- Termómetro de 0 a 100 °C
- Solución salina
- Crio viales

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. Procedimiento experimental :

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

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

Para ello debemos seguir los siguientes pasos:



5.1 Preparación de Suspensión de Glóbulos rojos al 5%

Técnica

- 1.- se toma sangre total anti coagulada con CPDA 1 del grupo "A" y "B" respectivamente. En un tubo de tamaño de 13 x 100 mm
- 2.- agregar c.s.p. tubo lleno de cloruro de sodio al 0.9%
- 3.- centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos y decantar el sobrenadante.
- 4.- repetir por tres veces el lavado.
- 5.- finalmente preparar la suspensión de glóbulos rojos al 5% agregando en tubo limpio y seco 01 una gota de glóbulos rojos puros y lavados completando con 19 gotas de cloruro de sodio al 0.9%
- 6.- inocular al conejo la dosis según el día que corresponde.

b. RECOMENDACIONES PARA EL CUIDADO DEL ANIMAL.

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

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



CUADRO 2.2
ESPACIO RECOMENDADO PARA CONEJOS, GATOS,
PERROS, PRIMATES Y AVES

ANIMAL	PESO Kg.	ÁREA DE PISO/ANIMAL m ²	ALTURA cm ² .
Conejos	menos de 2	0.14	35.6
	hasta 4	0.27	35.6
	hasta 5.4	0.36	35.6
	más de 5.4	0.45 o más	35.6
Gatos	menos o igual a 4	0.27	61.0
	más de 4	0.36 o más	61.0
Perros (1)	menos de 15	0.72	-
	hasta 30	1.08	-
	más de 30	o más	-
Palomas (2)	-	0.072	-
Codornices (2)	-	0.022	-
Gallinas (2)	menos de 0.25	0.022	-
	hasta 0.5	0.045	-
	hasta 1.5	0.09	-
	hasta 3.0	0.18	-
	más de 3.0	0.27 o más	-

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

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

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

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



- Extraer aproximadamente 5.0 mL de sangre por punción de la vena marginal de la oreja y colocar la muestra en tubo estéril y dejar que coagule para centrifugar la muestra de sangre a 2500 rpm durante 10 minutos y obtener posteriormente el suero bajo condiciones de esterilidad en crio vial estéril.



- Previa desinfección con alcohol, aplicar por vía intramuscular 0.5 mL de antígeno inactivado los días 0 y 14. Si la respuesta inmune es débil, se recomienda inocular al animal los días 28 y 4.
- En tubos, obtener 5 mL de sangre el día 14, 28 y 42 y procesar el suero como se mencionó arriba para obtener el suero y distribuirlo en alícuotas en crio viales estériles con la identificación de la fecha correspondiente.
- Congelar las muestras a -20°C .
- Mediante una prueba de aglutinación en placa de vidrio cuadrículada depositar 20 μl de la solución salina y 20 μl del suero problema.
- Homogeniza la suspensión con palillo de madera.
- Alternamente, realizan diluciones dobles seriadas del suero en PBS y agregar 10 μl del antígeno...
- Homogeneizar la suspensión y dejar reposar durante dos minutos para observar la aglutinación.

6. Resultados

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

Se recomienda realizar la prueba de aglutinaciones en ambientes donde la temperatura oscile entre 20 y 22 $^{\circ}\text{C}$.



7. Conclusiones

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: 2007. Inmunología de Kuby. Ed. McGraw-Hill. México. Sexta edición. ISBN 13: 978-970-10-645
- Tizard, I.R.: 2004. Veterinary immunology, an introduction. Saunders, Elsevier, USA. Sevent edition. ISBN 0-7216-0136-74-2
- Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1. Ottawa. 1980. 106 p.p.



Guía de práctica N° 04:

PROCESO DE INMUNIZACIÓN EN ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN ACTIVANDO RESPUESTA INMUNE HUMORAL Y CELULAR

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Pproceso de inmunización en animales de experimentación activando respuesta inmune humoral y celular Segunda semana

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Discrimina el comportamiento de los antígenos mediante un proceso de inmunización en animales de experimentación. Observar cambios fisiológicos En el animal de experimentación.

3. Equipos y materiales a utilizar:

K. Biológico

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

L. Medico clínico

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

M. De campo

- Alimento comercial para conejos en etapa adulta
- Jaulas metálicas



N. De Laboratorio

- Congelador -20 °C
- Refrigerador
- Centrifuga clínica a 5000 RPM
- Luz para aglutinaciones
- Termómetro de 0 a 100 °C
- Solución salina
- Crio viales

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

9. Procedimiento experimental :

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

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

Para ello debemos seguir los siguientes pasos:



5.1 Preparación de Suspensión de Glóbulos rojos al 5%

Técnica

- 1.- se toma sangre total anti coagulada con CPDA 1 del grupo "A" y "B" respectivamente. En un tubo de tamaño de 13 x 100 mm**
- 2.- agregar c.s.p. tubo lleno de cloruro de sodio al 0.9%**
- 3.- centrifugar a 2500 rpm durante 3 minutos y decantar el sobrenadante.**
- 4.- repetir por tres veces el lavado.**
- 5.- finalmente preparar la suspensión de glóbulos rojos al 5% agregando en tubo limpio y seco 01 una gota de glóbulos rojos puros y lavados completando con 19 gotas de cloruro de sodio al 0.9%**
- 6.- inocular al conejo la dosis según el día que corresponde.**

c. RECOMENDACIONES PARA EL CUIDADO DEL ANIMAL.

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

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



CUADRO 2.2
ESPACIO RECOMENDADO PARA CONEJOS, GATOS,
PERROS, PRIMATES Y AVES

ANIMAL	PESO Kg.	ÁREA DE PISO/ANIMAL m ²	ALTURA cm ² .
Conejos	menos de 2	0.14	35.6
	hasta 4	0.27	35.6
	hasta 5.4	0.36	35.6
	más de 5.4	0.45 o más	35.6
Gatos	menos o igual a 4	0.27	61.0
	más de 4	0.36 o más	61.0
Perros (1)	menos de 15	0.72	-
	hasta 30	1.08	-
	más de 30	o más	-
Palomas (2)	-	0.072	-
Codornices (2)	-	0.022	-
Gallinas (2)	menos de 0.25	0.022	-
	hasta 0.5	0.045	-
	hasta 1.5	0.09	-
	hasta 3.0	0.18	-
	más de 3.0	0.27 o más	-

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

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

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

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



- Extraer aproximadamente 5.0 mL de sangre por punción de la vena marginal de la oreja y colocar la muestra en tubo estéril y dejar que coagule para centrifugar la muestra de sangre a 2500 rpm durante 10 minutos y obtener posteriormente el suero bajo condiciones de esterilidad en crio vial estéril.



- Previa desinfección con alcohol, aplicar por vía intramuscular 0.5 mL de antígeno inactivado los días 0 y 14. Si la respuesta inmune es débil, se recomienda inocular al animal los días 28 y 4.
- En tubos, obtener 5 mL de sangre el día 14, 28 y 42 y procesar el suero como se mencionó arriba para obtener el suero y distribuirlo en alícuotas en crio viales estériles con la identificación de la fecha correspondiente.
- Congelar las muestras a -20°C .
- Mediante una prueba de aglutinación en placa de vidrio cuadrículada depositar 20 μl de la solución salina y 20 μl del suero problema.
- Homogeniza la suspensión con palillo de madera.
- Alternamente, realizan diluciones dobles seriadas del suero en PBS y agregar 10 μl del antígeno...
- Homogeneizar la suspensión y dejar reposar durante dos minutos para observar la aglutinación.

10. Resultados

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

Se recomienda realizar la prueba de aglutinaciones en ambientes donde la temperatura oscile entre 20 y 22 $^{\circ}\text{C}$.



11. Conclusiones

12. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: 2007. Inmunología de Kuby. Ed. McGraw-Hill. México. Sexta edición. ISBN 13: 978-970-10-645
- Tizard, I.R.: 2004. Veterinary immunology, an introduction. Saunders, Elsevier, USA. Sevent edition. ISBN 0-7216-0136-74-2
- Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1. Ottawa. 1980. 106 p.p.



Guía de práctica N° 05:

EVALUACIÓN DE INMUNIZACIÓN MEDIANTE TITULACIÓN DE ANTICUERPOS

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hijar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Evaluación De Inmunización Mediante Titulación De Anticuerpos

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Calcular la cantidad de Anticuerpos producidos por el sistema inmunológico humoral del conejo, el cual fue previamente inoculado con antígenos.

3. Equipos y materiales a utilizar:

O. Biológico

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

P. De Laboratorio

- Centrifuga clínica a 5000 RPM
- Luz para aglutinaciones
- Solución salina
- Tubos

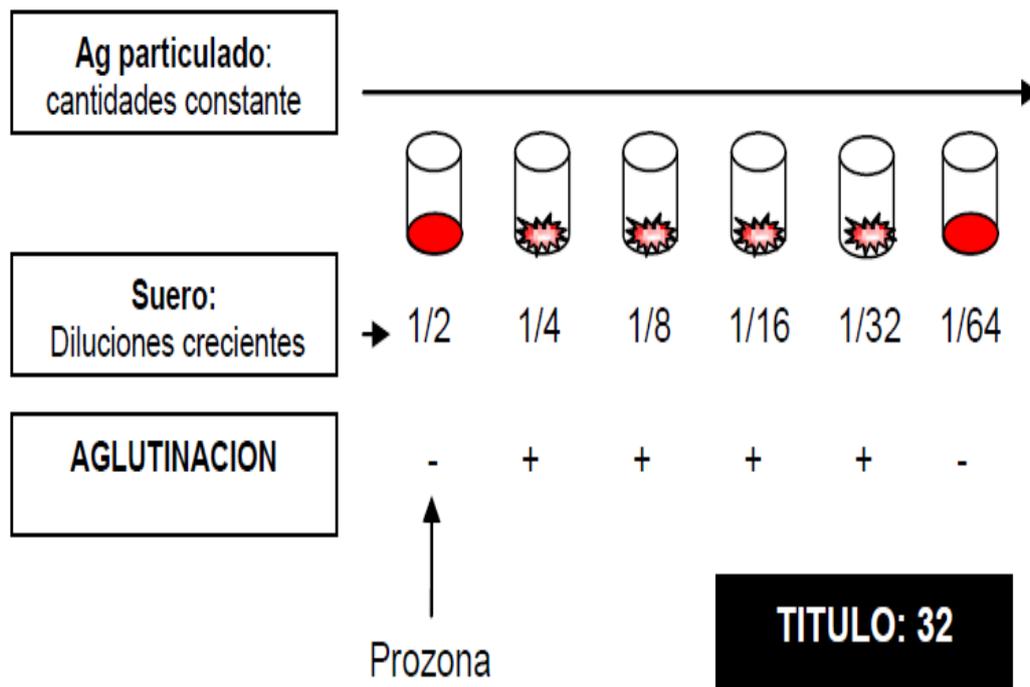


- Plumón indeleble
- Gradillas

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

4. Procedimiento experimental :

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



a. PROCEDIMIENTO

Para el suero del séptimo día de post-inoculación.

- Rotular 10 tubos seriada mente con el nombre de los títulos a realizar en cada uno de ellos. (por ejemplo: $\frac{1}{2}$, $\frac{1}{4}$, etc.)
- Colocarlos en una gradilla en orden ascendente
- Dispensar en cada uno de ellos 100 ul de CINA.
- En el primer tubo ($\frac{1}{2}$) agregar también 100 ul de la suspensión de Glóbulos Rojos al 5 % del grupo A.
- Coger 100 ul del primer tubo y dispensar en el segundo, homogenizar y volver a coger 100 ul y dispensar en el tercer tubo, repetir este procedimiento hasta llegar al último tubo.
- Centrifugar a 3400 rpm x 15 segundos.
- Observar el botón hemático y anotar los dils.

REPETIR LOS MISMOS PASOS PARA LAS MUESTRAS SERICAS DE LOS DIAS 10, 13 Y 15 POSTERIOR A LA INOCULACION.



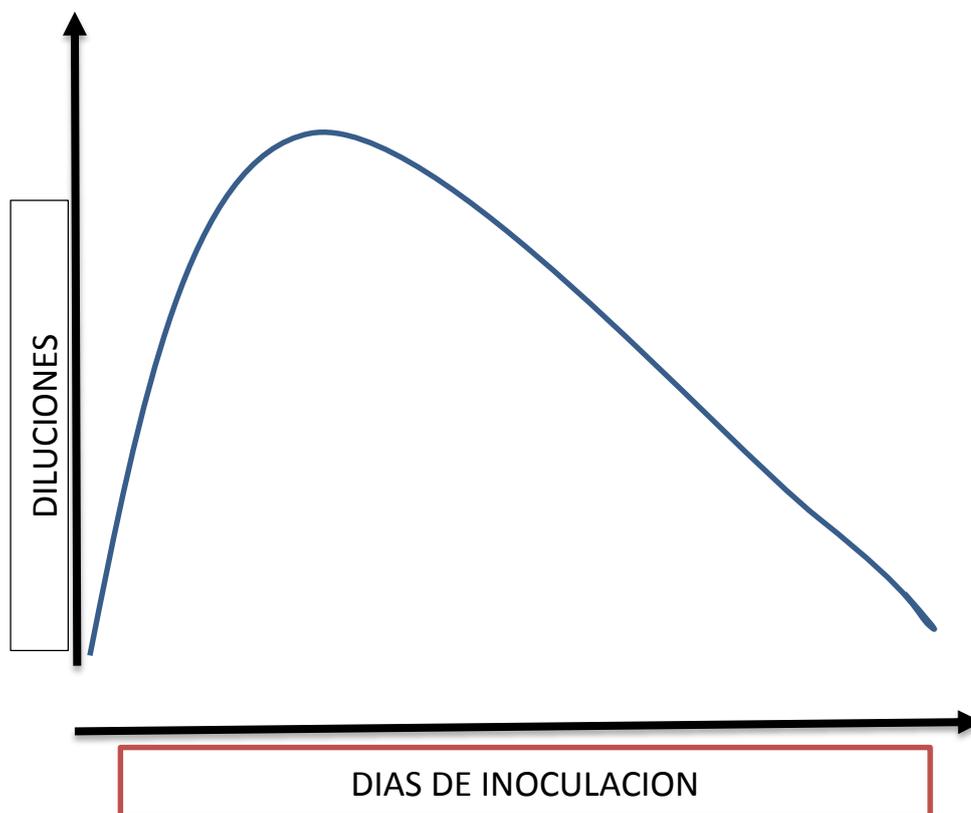
5. Resultados

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

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

- a. REALIZAR UNA CURVA PARA OBSERVAR EL PICO MAXIMO DE DILS EN BASE A LOS DIAS QUE TRANSCURRIERON DE LA INOCULACION.

EJEMPLO:





6. Conclusiones

7. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Kindt, T.J., Goldsby, R.A., Osborne, B.A.: 2007. Inmunología de Kuby. Ed. McGraw-Hill. México. Sexta edición. ISBN 13: 978-970-10-645
- Tizard, I.R.: 2004. Veterinary immunology, an introduction. Saunders, Elsevier, USA. Sevent edition. ISBN 0-7216-0136-74-2
- Canadian Council on Animal Care. Guide to the care and use of experimental animals. Vol 1. Ottawa. 1980. 106 p.p



Guía de práctica N° 06:

DIAGNOSTICO SEROLÓGICO DE FIEBRE TIFOIDEA, SÍFILIS Y BRUCELOSIS

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Diagnóstico serológico de fiebre tifoidea, sífilis y brucelosis (antígenos febriles,VDRL,RPR,Rosa de Bengala)

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

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

3. Equipos y materiales a utilizar:

Q. Biológico

- suero sanguíneo
- plasma sanguíneo.

R. De Laboratorio

- Aglutinoscopio
- Microscopio binocular



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

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. Procedimiento experimental :

PROCEDIMIENTO

I- TECNICA RAPIDA EN PLACA

Colocar en una placa una gota (50 ul) de suero y agregar una gota (50 ul) de suspensión de Antígeno.

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

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

II- TITULACION RAPIDA EN PLACA

1) Dividir una placa de vidrio en sectores de 4 cm² aproximadamente.

2) Empleando las micropipetas apropiadas colocar en estos sectores 80 ul, 40 ul, 20 ul, 10 ul y

5 ul de suero límpido. Repetir el procedimiento para un control negativo y uno positivo.

3) Colocar 1 gota de Antígeno previamente agitado sobre cada gota de



suero.

4) Mezclar el suero y el Antígeno utilizando una varilla abarcando un área de 2 cm de diámetro

Aproximadamente. Debe emplearse una varilla distinta para cada dilución de suero o la

Misma varilla mezclando a partir de la muestra más diluida.

5) Agitar la placa durante 2 minutos en forma circular.

6) Observar la aglutinación utilizando luz indirecta sobre fondo oscuro.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

4+: todos los microorganismos aglutinan.

3+: aglutinan aproximadamente el 75%.

2+: aglutinan aproximadamente el 50%.

1+: aglutinan aproximadamente el 25%.

Negativo: no aparece aglutinación.

Técnica I: se indica solamente positivo o negativo.

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

Considerando las diluciones como se muestra a continuación:

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

0,08 1:20

0,04 1:40

0,02 1:80

0,01 1:160

0,005 1:320

R.P.R. reaginas.

PROCEDIMIENTO

I- PRUEBA CUALITATIVA

Llevar a temperatura ambiente los reactivos y la muestra antes de realizar el



ensayo. En cada uno de los círculos de la tarjeta de reacción colocar con un gotero plástico provisto:

Muestra o Controles 1 gota (50 ul) Con el extremo cerrado del gotero distribuir la muestra uniformemente en todo el círculo. Con el gotero metálico provisto, en posición vertical, agregar en el centro del círculo: Reactivo A 1 gota (17 ul) SIN MEZCLAR, hacer rotar horizontalmente la tarjeta de reacción en forma manual o con agitador rotativo a 100 rpm durante 8 minutos. Observar la presencia o ausencia de aglutinación al cabo de este tiempo. Tiempos de lectura mayores pueden dar lugar a falsos resultados.

II- PRUEBA SEMICUANTITATIVA

Efectuar diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, hasta 1:64 empleando solución fisiológica y proceder de la misma manera que en la técnica cualitativa. El título estará dado por la inversa de la última dilución que se observe reactiva.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Reactivo: presencia de aglutinación visible en forma de grumos negros sobre el fondo claro que indica presencia de "reaginas" en la muestra.

No reactivo: aspecto gris homogéneo que indica ausencia de "reaginas" en la muestra.

ROSA DE BENGALA:

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Rosa de Bengala es una técnica de aglutinación en porta para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-Brucela en suero humano. La suspensión bacteriana y coloreada, es aglutinada por anticuerpos IgG o IgM presentes en el suero del paciente.

PROCEDIMIENTO

Método cualitativo

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. La sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
2. Depositar 50 µL de la muestra a ensayar y una gota de cada uno de los



controles Positivo y Negativo, sobre círculos distintos de un porta.

3. Mezclar el reactivo de R. de Bengala vigorosamente o con el agitador vortex antes de usar. Depositar una gota (50 μ L) junto a cada una de las gotas anteriores.

4. Mezclar las gotas con un palillo, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear palillos distintos para cada muestra.

5. Situar el porta sobre un agitador rotatorio a 80 – 100 r.p.m. durante 4 minutos. El exceso de tiempo de agitación puede originar la aparición de falsos positivos.

Método semicuantitativo

1. Realizar diluciones dobles de la muestra en solución salina 9 g/L.

2. Proceder para cada dilución, como en la prueba cualitativa. **LECTURA E INTERPRETACIÓN** Examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar el porta del agitador. La presencia de aglutinación indica una concentración de anticuerpos anti-Brucela igual o superior a 25 UI/mL.

En el método semicuantitativo, se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo. **CÁLCULOS** La concentración aproximada de anticuerpos anti-Brucella en la muestra del paciente se obtiene de la siguiente manera: $25 \times \text{Título de anti-Brucella} = \text{UI/ML}$.

VALORES DE REFERENCIA

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

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

1. Sensibilidad analítica: 25 (± 5) UI/mL, en las condiciones descritas en el ensayo.

2. Efecto prozona: No se observa efecto prozona hasta valores de 1000 UI/mL.

3. Sensibilidad diagnóstica: 100%

4. Especificidad diagnóstica: 98%

6. Resultados



7. Conclusiones

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- 1. Young E J. Clinical Infectious Diseases 1995; 21: 283-290.
- 2. Alton GC. Techniques for Brucellosis Laboratory INRA Paris, 1988.
- 3. Ariza J. Current Opinion in Infectious Diseases 1996; 9: 126-131.
- 4. Comité mixto FAO/OMS de expertos en Brucelosis. WLD Health Org Tech Rep Ser 1958; 148: 1-60.
- 5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed. AACC Press, 1995



Guía de práctica N° 07:

TURBIDIMETRIA, NEFELOMETRÍA, AGLUTINACIÓN EN LATEX DE PROTEÍNAS ESPECIALES

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hijar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Turbidimetria, Nefelometria, Aglutinación en Látex de las proteínas especiales

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

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

3. Equipos y materiales a utilizar:

S. Biológico

- suero sanguíneo
- plasma sanguíneo.

T. De Laboratorio

- Aglutinoscopio
- Microscopio binocular
- Láminas de vidrio cóncavas
- Tarjetas de reacción por floculación



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

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. Procedimiento experimental :

PROCEDIMIENTO

I- TECNICA RAPIDA EN PLACA

Colocar en una placa una gota (50 ul) de suero y agregar una gota (50 ul) de suspensión de Antígeno.

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

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

II- TITULACION RAPIDA EN PLACA

1) Dividir una placa de vidrio en sectores de 4 cm² aproximadamente.

2) Empleando las micropipetas apropiadas colocar en estos sectores 80 ul, 40 ul, 20 ul, 10 ul y

5 ul de suero límpido. Repetir el procedimiento para un control negativo y uno positivo.

3) Colocar 1 gota de Antígeno previamente agitado sobre cada gota de suero.

4) Mezclar el suero y el Antígeno utilizando una varilla abarcando un área de



2 cm de diámetro

Aproximadamente. Debe emplearse una varilla distinta para cada dilución de suero o la

Misma varilla mezclando a partir de la muestra más diluida.

5) Agitar la placa durante 2 minutos en forma circular.

6) Observar la aglutinación utilizando luz indirecta sobre fondo oscuro.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

4+: todos los microorganismos aglutinan.

3+: aglutinan aproximadamente el 75%.

2+: aglutinan aproximadamente el 50%.

1+: aglutinan aproximadamente el 25%.

Negativo: no aparece aglutinación.

Técnica I: se indica solamente positivo o negativo.

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

Considerando las diluciones como se muestra a continuación:

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

0,08 1:20

0,04 1:40

0,02 1:80

0,01 1:160

0,005 1:320

R.P.R. reaginas.

PROCEDIMIENTO

I- PRUEBA CUALITATIVA

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



Muestra o Controles 1 gota (50 ul) Con el extremo cerrado del gotero distribuir la muestra uniformemente en todo el círculo. Con el gotero metálico provisto, en posición vertical, agregar en el centro del círculo: Reactivo A 1 gota (17 ul) SIN MEZCLAR, hacer rotar horizontalmente la tarjeta de reacción en forma manual o con agitador rotativo a 100 rpm durante 8 minutos. Observar la presencia o ausencia de aglutinación al cabo de este tiempo. Tiempos de lectura mayores pueden dar lugar a falsos resultados.

II- PRUEBA SEMICUANTITATIVA

Efectuar diluciones seriadas 1:2, 1:4, 1:8, hasta 1:64 empleando solución fisiológica y proceder de la misma manera que en la técnica cualitativa. El título estará dado por la inversa de la última dilución que se observe reactiva.

INTERPRETACION DE LOS RESULTADOS

Reactivo: presencia de aglutinación visible en forma de grumos negros sobre el fondo claro que indica presencia de "reaginas" en la muestra.

No reactivo: aspecto gris homogéneo que indica ausencia de "reaginas" en la muestra.

ROSA DE BENGALA:

PRINCIPIO DEL MÉTODO

El Rosa de Bengala es una técnica de aglutinación en porta para la detección cualitativa y semicuantitativa de anticuerpos anti-Brucela en suero humano. La suspensión bacteriana y coloreada, es aglutinada por anticuerpos IgG o IgM presentes en el suero del paciente.

PROCEDIMIENTO

Método cualitativo

1. Atemperar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. La sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
2. Depositar 50 µL de la muestra a ensayar y una gota de cada uno de los controles Positivo y Negativo, sobre círculos distintos de un porta.
3. Mezclar el reactivo de R. de Bengala vigorosamente o con el agitador



vortex antes de usar. Depositar una gota (50 μ L) junto a cada una de las gotas anteriores.

4. Mezclar las gotas con un palillo, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear palillos distintos para cada muestra.

5. Situar el porta sobre un agitador rotatorio a 80 – 100 r.p.m. durante 4 minutos. El exceso de tiempo de agitación puede originar la aparición de falsos positivos.

Método semicuantitativo

1. Realizar diluciones dobles de la muestra en solución salina 9 g/L.

2. Proceder para cada dilución, como en la prueba cualitativa. **LECTURA E INTERPRETACIÓN** Examinar macroscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar el porta del agitador. La presencia de aglutinación indica una concentración de anticuerpos anti-Brucela igual o superior a 25 UI/mL.

En el método semicuantitativo, se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo. **CÁLCULOS** La concentración aproximada de anticuerpos anti-Brucella en la muestra del paciente se obtiene de la siguiente manera: $25 \times \text{Título de anti-Brucella} = \text{UI/ML}$.

VALORES DE REFERENCIA

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

CARACTERÍSTICAS DEL MÉTODO

1. Sensibilidad analítica: 25 (± 5) UI/mL, en las condiciones descritas en el ensayo.

2. Efecto prozona: No se observa efecto prozona hasta valores de 1000 UI/mL.

3. Sensibilidad diagnóstica: 100%

4. Especificidad diagnóstica: 98%



6. Resultados

7. Conclusiones

8. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- 1. Young E J. Clinical Infectious Diseases 1995; 21: 283-290.
- 2. Alton GC. Techniques for Brucellosis Laboratory INRA Paris, 1988.
- 3. Ariza J. Current Opinion in Infectious Diseases 1996; 9: 126-131.
- 4. Comité mixto FAO/OMS de expertos en Brucelosis. WLD Health Org Tech Rep Ser 1958; 148: 1-60.
- 5. Young DS. Effects of drugs on clinical laboratory test, 4th ed. AACC Press, 1995



Guía de práctica N° 08:

**AISLAMIENTO DE LINFOCITOS T. y B. EN DONANTES
CADAVERICO EN COBAYOS Y PRUEBA SEROLOGICA HLA
CLASE I Y CLASE II.**

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Aislamiento de Linfocitos T y B En Donantes Cadavérico en Cobayos y Prueba serológica HLA Clase I y II

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

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

3. Equipos y materiales a utilizar:

U. Biológico

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

V. De Laboratorio

- Equipo de disección
- medios de viabilidad celular:



- cloruro de sodio al 0.9%
- solución LIS
- Placas Terazaki
- Colorante Flouruquench
- Pipetas de Jeringa Hamilton
- Pipetas Pasteur
- Perlas inmunomagnéticas para células linfocitos T y B
- Magneto
- Microscopio de campo oscuro invertido
- Cabina de Flujo Laminar
- Tubos Falco
- jeringas de 20 cc
- Insertos de cada reactivo para su buen uso
- Poes

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

SIGNIFICACION CLINICA

El aislamiento de linfocitos se realiza con el propósito de diferenciar células de alta especificidad para desarrollar pruebas de histocompatibilidad serológica clase I y Clase II, se utiliza perlas inmunomagnéticas,

PROCEDIMIENTO:

- 1.- Extraer los órganos hematopoyéticos ganglios linfáticos y bazo
- 2.- en un recipiente de metal agregar el órgano en un medio líquido de solución de medio de viabilidad celular para aislamiento de linfocitos.
- 3.- con la ayuda de una jeringa y una aguja de 21 x 1 ½
- 4.- inocular a cada ganglio y al bazo el medio líquido para separar los linfocitos T y B de los mismos
- 5.- agregar en 2 tubos con EDTA unos 5 ml
- 6.- agregar 100ul de perlas inmunomagnéticas para linfocitos B y T respectivamente.
- 7.- colocar al magneto por 5 minutos
- 8.- con la ayuda de la pipeta pastear separar el sobrenadante, dejando las células adheridas en las paredes del tubo de ensayo.



- 9.- repetir por tres veces con solución del medio de viabilidad celular.
- 10.- al finar retirar todo el sobrenadante y agregar 11 gotas del medio en el tubo de células T, y 5gotas del medio en el tubo de células B.
- 11.- suspendido las células cargar en la placa de Tera sakí
- 12.- agregar colorante Flouruquench. A cada pozo para su tinción
- 13.- llevar al microscopio para observar a las células T y B. respectivamente.
- 14.- anotar los hallazgos.

6. Conclusiones

7. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- - Folleto instructivo del producto "Denco, CRP-Test".
- Carter-Wallace, Cranbury, E.U.A. Folleto instructivo del producto "Reumagen-PCR" (1986) Barcelona, España.
- Gorevic, P.D. (1983) Assessment of immunoglobulins and other serum proteins: gammopathies. En: Immunodiagnosis for Clinicians (Grieco, M.H. y Meriney, D.K., Eds.), p.77. Chicago: Year Book Medical Publishers.
- Horowitz, J., Volanakis, J. y Briles, D. (1987) Blood clearance of S. pneumoniae by C-reactive protein. J. Immunol. 138, 2598. Roitt, I.M. (1985) Immunology, p.1.3 London, Gower Medical Publishing.
- Tejani, N.R., Chonmaitree, T., Rassin, D.K., Howie, V.M., Owen, M.J. y Goldman, A.S. (1995) Use of C-reactive protein



Guía de práctica N° 09:

INMUNOFLUORESCENCIA INDIRECTA ANTICUERPOS ANTINUCLEARES (ANA)

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hijar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Inmunofluorescencia Indirecta mediante la prueba de Anticuerpos antinucleares (ANA).

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

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

3. Equipos y materiales a utilizar:

W. Biológico

- suero
- sueros conocidos con títulos altos

X. De Laboratorio

- Microscopio de Inmunofluorescencia de campo oscuro
- kit de Anticuerpos Antinucleares:
- Solución PBS
- Punteras



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

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

SIGNIFICACION CLINICA

El término “anticuerpos antinucleares” describe una variedad de autoanticuerpos que reacciona con los constituyentes de los núcleos celulares incluyendo el ADN, ARN y varias proteínas y ribonucleoproteínas.¹ Estos autoanticuerpos aparecen con elevada frecuencia en pacientes con enfermedades reumáticas o del tejido conectivo, y especialmente en el caso del lupus eritematoso sistémico. De hecho, prácticamente todos los pacientes con LES son ANA positivos. Esta sensibilidad diagnóstica ha conducido a la incorporación del ensayo ANA en los Criterios Revisados para la Clasificación de Lupus Eritematoso Sistémico de 1982 realizados por una subcomisión del Colegio Americano de Reumatología.² Aunque los ensayos ANA son un excelente test de screening para el LES (un resultado negativo prácticamente permite descartar la presencia de LES³ activo), no son, de ningún modo, un ensayo específico. Los pacientes con otras enfermedades del tejido conectivo, como la artritis reumatoide, el escleroderma y la dermatomiositis, dan con frecuencia resultados positivos, y también pueden



observarse valoraciones de ANA bajas en otros estados patológicos y en la población normal. Pueden obtenerse resultados positivos para ANA en pacientes que han sufrido quemaduras graves o infecciones víricas y también se han dado casos en algunas personas normales sanas, especialmente en las poblaciones de mayor edad. Debido a esta ausencia de especificidad, se recomienda que todas las muestras con resultados positivos para ANA se valoren según el punto final y que se lleven a cabo ensayos más específicos para autoanticuerpos anti-ADN de doble cadena (dsDNA) y para autoanticuerpos anti-antígeno nuclear extraíble (ENA).

PROCEDIMIENTO:

Preparación de los portaobjetos con substrato: Espere a que el portaobjetos con substrato alcance la temperatura ambiente antes de extraerlo de su funda. Etiquételo y colóquelo en una cámara húmeda adecuada. Añada 1 gota (20-25 L) de control positivo y negativo sin diluir en los pocillos 1 y 2 respectivamente.

1.- Añada 1 gota (20-25 L) de la muestra del paciente diluida a los pocillos restantes.

2. Incubación del portaobjetos: Incube el portaobjetos durante 30 + 5 minutos en una cámara húmeda (una servilleta de papel humedecida colocada plana en el fondo de un recipiente cerrado de plástico o cristal le permitirá mantener las condiciones de humedad adecuadas). No permita que el substrato se seque durante el procedimiento de ensayo. 4

3. Lavado de los portaobjetos: Tras la incubación, utilice un frasco de lavado o una pipeta para lavar suavemente el suero con el tampón de PBS II diluido. Oriente el portaobjetos y el chorro del tampón PBS II de forma que le permita evitar, en la medida de lo posible, que la solución pase por encima de varios pocillos a la vez. Evite dirigir el chorro directamente sobre los pocillos para que no se dañe el substrato. Si está deseado, ponga los



portaobjetos en un tarro de Coplin del almacenador intermedio diluido de PBS II por hasta 5 minutos.

4. Adición de conjugado fluorescente: Expulse el exceso de tampón PBS II. Sitúe el portaobjetos de nuevo en la cámara húmeda y cubra inmediatamente cada pocillo con una gota de conjugado fluorescente. Incube los portaobjetos durante otro 30 + 5 minutos.

5. Lavado de los portaobjetos: Repita el paso 3.

6. Cubreobjetos: Los procedimientos para los cubreobjetos varían de un laboratorio a otro; sin embargo, recomendamos el siguiente procedimiento:
a. Sitúe un cubreobjetos en una toallita de papel. b. Aplique el medio de montaje siguiendo una línea continua en el borde inferior del cubreobjetos. c. Elimine el exceso de tampón PBS II y ponga en contacto del borde inferior del portaobjetos con el borde del cubreobjetos. Deje caer suavemente el portaobjetos sobre el cubreobjetos de forma que el medio de montaje fluya hacia el borde superior del portaobjetos sin que se formen burbujas de aire ni se queden atrapadas.

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Reacción Negativa.

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

Reacción Positiva.

Se considerará una muestra como positiva si la tinción específica es superior al Control Negativo para Sistemas IFA. Determine el patrón de tinción de cada muestra y pondere su intensidad de acuerdo con los siguientes



criterios: 4+ Fluorescencia verde manzana brillante 3+ Fluorescencia verde manzana claro 2+ Fluorescencia positiva claramente visible 1+ La menor fluorescencia específica que permite diferenciar claramente una nuclear y/u citoplasmática estructura celular de la fluorescencia de fondo.

Anotar sus hallazgos discriminar los mismos.

6. Conclusiones :

7. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Tan EM: Autoantibodies to nuclear antigens (ANA):
- Their immunobiology and medicine. *Advances in Immunology* 33: 167-239, 1982.
- 2. Tan EM, et al.: The 1982 Revised criteria for the classification of systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 25: 1271-1277, 1982.
- 3. Casalo SP, Friou GJ and Myers LL: Significance of antibodies to DNA in systemic lupus erythematosus. *Arthritis and Rheumatism* 7: 379-390, 1964.
- 4. Gonzalez E and Rothfield N: Immunoglobulin class and pattern of nuclear fluorescence in systemic lupus erythematosus. *The New England Journal of Medicine* 274: 1333-1338, 1966.



Guía de práctica N° 10:

ENZIMOINMUNO ANÁLISIS (ELISA)

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: ENZIMOINMUNOENSAYO (ELISA)

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

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

3. Equipos y materiales a utilizar:

Y. Biológico

- suero
- sueros controles

Z. De Laboratorio

- Analizador de Elisa
- kit de ELISA Anti HIV 1-2:
- Microplacas
- Diluyente
- Conjugado
- Substrato
- Solución de Lavado
- Lavador de Elisa
- Incubadora



- Papel absorbente
- Cabina de Flujo Laminar
- Tubos Falco
- Pipetas automáticas
- Insertos de cada reactivo para su buen uso
- Poes

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

SIGNIFICACION CLINICA

Hasta ahora se han descrito e implicado como agentes causantes del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) 2 tipos de virus de la inmunodeficiencia humana, VIH-1 y VIH-2. Ambos son retrovirus que se transmiten por exposición a determinados fluidos corporales infectados, sobre todo, sangre y secreciones genitales, y por vía placentaria. La infección por VIH-1 está extendida por todo el mundo; mientras que la infección por VIH-2 está extendida principalmente en África occidental y en algunos países europeos.¹

PROCEDIMIENTO:

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

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

Pasó 3 Añada 25 μ L de diluyente de muestra a cada pocillo. 25 μ L

Paso 4 Añada 100 μ L de muestra o 100 μ L de controles a cada pocillo. Utilice la primera columna de pocillos de cada placa para los controles del ensayo. Añada los controles en los pocillos designados después de dispensar



las muestras. Pipetee 100 μ L de control negativo en cada uno de los 3 pocillos, de A1 a C1, y 100 μ L de los controles positivos para p24, anti-VIH-1 y anti-VIH-2 en los pocillos D1 a F1, respectivamente. Si coloca la placa sobre una superficie blanca, le será más fácil añadir la muestra. 100 μ L

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

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

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

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

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

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

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

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

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



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

5. Resultados no reactivos

Las muestras cuyos valores de absorbancia sean inferiores al valor del punto de corte se consideran negativas.

Resultados reactivos

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

6. Conclusiones:



7. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

1. Clavel, F. (1987). HIV-2: the West African AIDS virus. *AIDS*
2. Simon, F. et al. (1998). Identification of a new human immunodeficiency virus type 1 distinct from group M and group O. *Nat. Med.*, 4, 1032.
3. Denis, F., Leonard, G. et al. (1988). Comparison of 10 enzyme immunoassays for the detection of antibody to human immunodeficiency virus type 2 in West African sera. *J. Clin. Microbiol.*, 26, 1000.
4. Van den Haesevelde, M., Decourt, J. et al. (1994). Genomic cloning and complete sequence analysis of a highly divergent African human immunodeficiency virus isolate. *J. Virol.*, 68, 1586.
5. Gürtler, L.G., Hauser, P.H. et al. (1994). A new subtype of human immunodeficiency virus type 1 (MVP-5180) from Cameroon. *J. Virol.*, 68, 1581



Guía de práctica N° 11:

ANÁLISIS DE MULTIPLICACIÓN ENZIMÁTICA (EMIT)

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hijar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Análisis de multiplicación Enzimática.

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

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

3. Equipos y materiales a utilizar:

AA. Biológico

- Sangre total.
- Células controles.

BB. De Laboratorio

- Analizador de EMIT VIVA E
- kit de dosaje de ciclosporina
- kit de tacrolimus
- Diluyente
- Lisante
- Calibradores
- Solución de Lavado
- Metanol
- Vortex
- Centrifuga para biología molecular refrigerado



- Cabina de Flujo Laminar
- Tubos Ependorf
- Pipetas automáticas
- Insertos de cada reactivo para su buen uso
- Poes

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

SIGNIFICACION CLINICA

El tacrolimus es un agente macrólido inmunosupresor obtenido por fermentación del *Streptomyces tsukubaensis*, encontrado en el Japón. El tacrolimus ha sido estudiado en pacientes trasplantados de corazón, pulmón, hígado, riñón, páncreas, intestino delgado y médula ósea, siendo muy efectivo en la prevención del rechazo resistente a corticoides y ciclosporina. En este sentido, el tacrolimus es de 10 a 100 veces más potente de la ciclosporina. Tópicamente, el tacrolimus se utiliza para el tratamiento de la dermatitis atópica del adulto y del niño

PROCEDIMIENTO:

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

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

Pasó 3 añadir los lizantes a cada uno de los tubos

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

Paso 5 tape los tubos y reposo por 5 minutos

Paso 6. Llevar a mezclar al vortex por unos segundos

Paso 7 inmediatamente centrifugar a 12000 g por 5 minutos

Paso 8 retirar los tubos ependorf



Paso 9 programar a l analizador de drogas inmunosupresoras para su procedimiento analítico

Paso 10 esperar los resultados según sea el caso de los calibradores

Paso 11 realizar el mismo procedimeinto para los controles bajo, normal y alto

Paso 12 una vez que los valores estimen buena reproducción

Paso 13 analizar las muestras siguiendo el protocolo de los mismos

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

Conclusiones:



6. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Fleischer AB. Treatment of atopic dermatitis: role of tacrolimus ointment as a topical noncorticosteroid therapy. **J Allergy Clin Immunol** 1999; 104:S126—30.
- Plosker GL, Foster RH. Tacrolimus: a further update of its pharmacology and therapeutic use in the management of organ transplantation. **Drugs** 2000; 59:323—89.
- Fung JJ, Todo S, Jain A et al. Conversion from cyclosporine to FK 506 in liver allograft recipients with cyclosporine-related complications. **Transplant Proc** 1990; 22:6—12.
- Fung JJ, Todo S, Tzakis A et al. Conversion of liver allograft recipients from cyclosporine to FK 506 based immunosuppression: benefits and pitfalls. **Transplant Proc** 1991; 23:14—21.



Guía de práctica N° 12:

DIAGNOSTICO MARCADORES INFECCIOSOS HEPATITIS B Y C

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Diagnostico de marcadores infecciosos de Hepatitis B y C .

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Desarrolla las pruebas de ensayo por Quimioluminiscencia en el ARCHITEC 1000

3. Equipos y materiales a utilizar:

CC. Biológico

- Suero sanguíneo.
- Células controles.

DD. De Laboratorio

- Analizador de Quimioluminiscencia ARCHITEC 1000
- kit de dosaje de Antígeno de superficie
- kit de Anticuerpo total Core del hepatitis B
- kit de Anticuerpo total Core del hepatitis C
- Controles
- Calibradores
- Solución de Lavado
- Vortex
- Cabina de Flujo Laminar
- Pipetas automáticas



- Insertos de cada reactivo para su buen uso
- Poes

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

SIGNIFICACION CLINICA

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

PROCEDIMIENTO:

IMMULITE Anti-HBc es una fase sólida, dos paso Enzima quimio luminiscente Inmunoensayo. La fase sólida, una Bolas de poliestireno encerradas dentro de una prueba Unidad, se recubre con el recombinante purificado HBcAg producido en bacterias de E. coli. La muestra del paciente se añade a la Prueba Unidad que contiene un cordón recubierto. Un alcalino Anti-HBc monoclonal marcado con fosfatasa Anticuerpo también se añade a la Unidad de Prueba. Después de los pasos de lavado e incubación, Quimio luminiscente sufre Hidrólisis en presencia de productos alcalinos Fosfatasa IMMULITE Anti-HBc es un Ensayo competitivo de anticuerpos. El fotón Salida, medida por el luminómetro, Está inversamente relacionado con la presencia de Anticuerpos contra HBcAg en la muestra. Ciclos de incubación: 2 x 30 minutos.

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



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

Paso 3 añadir los reactivos a bordo

Paso 4 programar al analizador las pruebas requeridas

Paso 5 cargar las muestras en cada uno de los racks

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

Paso 7 dar inicio al analizador

Paso 8 monitorizar y conducir el análisis en software del equipo

Paso 9 esperar los resultados

Paso 10 analizarlos los resultados y validarlos

Paso 11 dar la validación e imprimirlos

Paso 12 reportar a las solicitudes según sea el caso

Paso 13 realizar los lavador y guardar los reactivos a bordo

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Interpretación se da según sea los cortes es

Reactivo si los valores están por encima del corte

No reactivo si los valores está por debajo del corte.

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

"Negativo" (co / s ratio de $<0,85$) Indica que los anticuerpos anti-HBc No detectado en la muestra. Es posible

El individuo no está infectado con el VHB. Cualquier resultado de

"Indeterminado" (co / s ratio Entre $0,85$ y $<1,15$) debe ser



Reevaluado. Las muestras que todavía prueban como "Indeterminado" debería ser probado por un Método alternativo, o una segunda muestra Deben tomarse - si es posible - dentro de un Tiempo razonable (por ejemplo, una semana). .

Conclusiones:

6. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Locarnini SA, Gust ID. Hepadnaviridae: virus de la hepatitis B y El delta virus. En: Balows A, et al, Editores Diagnóstico de laboratorio de Enfermedades infecciosas: principios y Prácticas. Nueva York: Springer-Verlag. Follett EAC. Diagnóstico de la hepatitis B infección.
- Young H. McMillan A, Editores Diagnóstico inmunológico de enfermedades de transmisión sexual. Nuevo York: Marcel Dekker, 1988: 433-49.
- Hollinger FB, Dienstag JL. Hepatitis B Y D. En: Lennette EH, et al, Editores Manual de la clínica
- microbiología. 6ª ed. Washington, D.C .: American Society for Microbiology, 1995: 1033 - 49



Guía de práctica N° 13:

QUIMIOLUMINISCENCIA PARA MARCADORES TUMORALES Y HORMONAS

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hijar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: Diagnostico de marcadores infecciosos de Hepatitis B y C .

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Desarrolla las pruebas de ensayo por Quimioluminiscencia en el INMULTE 2000XI

3. Equipos y materiales a utilizar:

EE. Biológico

- Suero sanguíneo.
- Controles y ajustadores.

FF. De Laboratorio

- Analizador de Quimioluminiscencia INMULTE 2000 XI
- kit de Hormonas femeninas
- kit de hormonas masculinas
- kit de hormonas tiroideas
- marcadores tumorales diversos
- kit de ferritina, vitamina B12, Acido Fólico
- ACTH
- Hormona de crecimiento



- Marcadores TORCH
- Pipetas automáticas
- Insertos de cada reactivo para su buen uso
- Poes

4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

PRINCIPIO ANALITICO

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

PROCEDIMIENTO:

IMMULITE para todas las pruebas tiene una reacción en una fase sólida, dos pasos Enzima quimio luminiscente Inmunoensayo. La fase sólida, una Bolas de poliestireno encerradas dentro de una prueba

Unidad, se recubre con el recombinante purificado las diferentes pruebas del menú producido en bacterias de E. coli. La muestra del paciente se añade a la Prueba Unidad que contiene un cordón recubierto. Un alcalino del analito a investigar monoclonal marcado con fosfatasa Anticuerpo también se añade a la Unidad de Prueba. Después de los pasos de lavado e incubación, Quimio luminiscente sufre Hidrólisis en presencia de productos alcalinos Fosfatasa IMMULITE depende del analito es un Ensayo competitivo de anticuerpos. El fotón Salida, medida por el luminómetro, Está inversamente



relacionado con la presencia de Anticuerpos contra el analito a investigar en la muestra. Ciclos de incubación: 2 x 30 minutos.

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

Paso 2 Utilice sólo el número de tubos de reaccionecesarios para calibrar y controlar y las muestras a determinar.

Pasó 3 añadir los reactivos a bordo

Paso 4 programar al analizador las pruebas requeridas

Paso 5 cargar las muestras en cada uno de los racs

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

Paso 7 dar inicio al analizador

Paso 8 monitorizar y conducir el análisis en software del equipo

Paso 9 esperar los resultados

Paso 10 analizarlos los resultados y validarlos

Paso 11 dar la validación e imprimirlos

Paso 12 reportar a las solicitudes según sea el caso

Paso 13 realizar el lavador y guardar los reactivos a bordo

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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



Conclusiones:

6. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- - Andrews NC. Disorders of iron metabolism. N Engl J Med. 1999;341:1986–95
- 2- Hoffman R, Benz Jr. EJ, Shattil SJ, et al., eds. Hematology: Basic Principles and Practice. 4th ed. Philadelphia, Pa: Churchill Livingstone; 2005:482.
- 3- Jacobs A, Beamish MR, Allison M. The measurement of circulating ferritin. J Clin Pathol. 1972;25:1003.
- 4- Jacobs A, Miller F, Worwood M, Beamish MR, Wardrop CA. Ferritin in the serum of normal subjects and patients with iron deficiency and iron overload. Br Med J. 1972;4:206–8
- 5- Olivieri NF et al. N Engl J Med. 1995;332:918–22. 6- Brittenham GM, et al. Am J Hematol. 1993;42:81-5.



Guía de práctica N° 14:
EXTRACCIÓN DE ADN

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hijar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: EXTRACCION DE ADN

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Desarrolla las pruebas de Biología Molecular mediante la extracción de DNA para realizar procedimientos de HLA de SSP

3. Equipos y materiales a utilizar:

GG. Biológico

- sangre total.

HH. De Laboratorio

- kit de extracción de DNA
- kit de PROTEINKINASA
- Termoblock
- Baño María a 70°C
- Alcohol isopropilico
- Eluato
- tubos Ependorf
- pipetas Ependorf
- Vortex
- Filtros
- Insertos de cada reactivo para su buen uso
- Poes



4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

PRINCIPIO ANALITICO

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

PROCEDIMIENTO:

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

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

Pasó 3 añadir los hemolisante

Paso 4 centrifugar según la indicación del inserto

Paso 5 agregar alcohol isopropilico

Paso 6. Repetir tres veces

Paso 7 añadir eluato a 70°C

Paso 8 filtrar con eluato por dos veces



Paso 9 centrifugar

Paso 10 el producto filtrado el material de DNA

Paso 11 medir al espectrofotómetro

Paso 12 reportar las concentraciones y pureza del ADN

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

INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Se mide las concentraciones y se concentra o se diluye según sea el caso. Anotar en ADN teca cada uno con sus concentraciones respectiva y se conserva a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$

Conclusiones:



5. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados

- Graham DE (1978) The isolation of high molecular weight DNA from whole organisms or large tissue masses. *Anal Biochem* 85: 609-613
- 2. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl Ac Res* 16: 1215
- 3. Olerup O, Zetterquist H (1992) HLA-DR typing by PCR amplification with sequence-specific primers (PCR-SSP) in two hours: An alternative to serological DR typing in clinical practice including donor recipient matching in cadaveric transplantation. *Tissue Antigens* 39: 225-335.
- 4. Bunce M, O'Neill CM, Barnado MCNM, Krausa P, Browning MJ, Morris PJ, Welsh KI (1995) Phototyping: comprehensive DNA typing for HLA-A, B, C, DRB1, DRB3, DRB4, DRB5 & DQB1 by PCR with 144 primer mixes utilizing sequence-specific primers (PCR-SSP) *Tissue Antigens* 46:355-367.
- 5. Blasczyk R, Hahn U, Wehling J, Huhn D, Salama A (1995) Complete subtyping of the HLA-A locus by sequence-specific amplification followed by direct sequencing or single-strand conformation polymorphism analysis. *Tissue Antigens* 46:86-95.



Guía de práctica N° 15:

TALLER DE MANEJO DE EQUIPOS DE ALTA TECNOLOGÍA

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: EXTRACCION DE ADN

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Desarrolla las el manejo de equipos de alta tecnología en el servicio de inmunología

3. Equipos y materiales a utilizar:

II. Biológico

- especímenes biológicos diversos.

JJ. De Laboratorio

- ANALIZADOR INMULITE 2000 xi
- ANALIZADOR DE DROGAS VIVA E
- TERMOCICLADOR FISHER CIENTIFICA
- LUMINOMETRO LUNINEX 100
- MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA DE CAMPO INVERTIDO PARA PLACAS DE AISLAMIENTOS
- INCUBADORA DE CULTIVOS CELULARES
- CAMPANA DE FLUJO LAMINAR
- ARCHITEK 1000 QUIMIOLUMINISCENCIA
- Vortex



4. Notas de seguridad: Tener en cuenta las normas de bioseguridad, y contar con los contenedores resistentes a la punción.

4. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

PRINCIPIO ANALITICO

El Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del servicio de inmunodiagnostico se aplica métodos inmunológicos y moleculares para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, infecciosas y la selección de receptores en trasplante de órganos. Fundamenta su trabajo en las buenas prácticas profesionales y en satisfacer los requisitos de sus clientes, legales reglamentarios e institucionales, brindando un alto nivel de confiabilidad, confidencialidad y oportunidad en los resultados emitidos. Para lograr este propósito, cuenta con equipos de alta tecnología, personal calificado y comprometido en implementar las políticas y procedimientos del Laboratorio, de acuerdo a los requisitos de la NTC ISO-IEC 17025:2005 para garantizar la implementación de un Sistema de Calidad orientado a la mejora continua de sus procesos, con el fin de obtener altos estándares de calidad técnica y de servicio.

PROCEDIMIENTO:

Paso 1 presentación y manejo del analizador de inmulate 2000

Paso 2 presentación y manejos de equipos de inmunofluorescencia

Pasó 3 presentaciones de equipos de biología molecular

Paso 4 presentación de equipos de autoinmunidad

Paso 5 presentación de equipos de cultivo celular y espermatoograma

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

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

Paso 8 evaluación oral de los mismos

Paso 9 informe de fichas técnicas



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

Conclusiones:

5. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados.

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



Guía de práctica N° 16:

TALLER DE MANEJO DE EQUIPOS DE ALTA TECNOLOGIA

Sección :	Apellidos :
Docente : Lic. Efraín Montes Hajar	Nombres :
	Fecha : .../.../..... Duración: 180 minutos
	Tipo de práctica: Individual () Grupal (X)

Instrucciones: Observar las normas de bioseguridad.

1. Tema: EXTRACCION DE ADN

2. Propósito/objetivo/logro/hipótesis:

Desarrolla las el manejo de equipos de alta tecnología en el servicio de inmunología

3. Equipos y materiales a utilizar:

KK.Biológico

- especímenes biológicos diversos.

LL. De Laboratorio

- ANALIZADOR INMULITE 2000 xi
- ANALIZADOR DE DROGAS VIVA E
- TERMOCICLADOR FISHER CIENTIFICA
- LUMINOMETRO LUNINEX 100
- MICROSCOPIO DE INMUNOFLUORESCENCIA DE CAMPO INVERTIDO PARA PLACAS DE AISLAMIENTOS
- INCUBADORA DE CULTIVOS CELULARES
- CAMPANA DE FLUJO LAMINAR
- ARCHITEK 1000 QUIMIOLUMINISCENCIA
- Vortex

4. Notas de seguridad:

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



5. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL :

PRINCIPIO ANALITICO

El Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular del servicio de inmunodiagnostico se aplica métodos inmunológicos y moleculares para el diagnóstico de enfermedades autoinmunes, infecciosas y la selección de receptores en trasplante de órganos. Fundamenta su trabajo en las buenas prácticas profesionales y en satisfacer los requisitos de sus clientes, legales reglamentarios e institucionales, brindando un alto nivel de confiabilidad, confidencialidad y oportunidad en los resultados emitidos. Para lograr este propósito, cuenta con equipos de alta tecnología, personal calificado y comprometido en implementar las políticas y procedimientos del Laboratorio, de acuerdo a los requisitos de la NTC ISO-IEC 17025:2005 para garantizar la implementación de un Sistema de Calidad orientado a la mejora continua de sus procesos, con el fin de obtener altos estándares de calidad técnica y de servicio.

PROCEDIMIENTO:

Paso 1 presentación y manejo del analizador de inmulate 2000

Paso 2 presentación y manejos de equipos de inmunofluorescencia

Pasó 3 presentaciones de equipos de biología molecular

Paso 4 presentación de equipos de autoinmunidad

Paso 5 presentación de equipos de cultivo celular y espermatoograma

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

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

Paso 8 evaluación oral de los mismos

Paso 9 informe de fichas técnicas



INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

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

Conclusiones:

6. Referencias bibliográficas consultadas y/o enlaces recomendados.

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