



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



MANUAL DE PRÁCTICAS DE INMUNOLOGIA MÉDICA



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



INDICE:

TEMA
PRÁCTICA 1: FAGOCITOSIS
PRÁCTICA 2: DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS T YB
ANEXO REACCIONES DE AGLUTINACIÓN
PRÁCTICA 3: PRUEBAS CRUZADAS
PRÁCTICA 4: INVESTIGACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-Rh
PRÁCTICA 5: DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA C-REACTIVA
PRÁCTICA 6: DETERMINACIÓN DE ANTIESTREPTOLISINAS
PRÁCTICA 7: FACTOR REUMATOIDE
PRÁCTICA 8: REACCIONES FEBRILES
PRÁCTICA 9: PRUEBA INMUNOLÓGICA DE EMBARAZO



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 1

FAGOCITOSIS

I. OBJETIVO.

El alumno observará microscópicamente varias fases del proceso de fagocitosis.

II. INTRODUCCIÓN.

Cuando un agente patógeno sobrepasa las barreras naturales constituidas por la piel y las mucosas, entra en acción un segundo mecanismo de defensa llamada fagocitosis.

La fagocitosis es llevada a cabo por macrófagos y neutrófilos, por lo que a estas células se les conoce como fagocitos.

Los neutrófilos se originan en la médula ósea a través de la línea mieloide, salen de la médula ósea y entran a los vasos sanguíneos en donde algunos circulan libremente y otros se adhieren a las paredes de los vasos de aquí pasan a los tejidos, a la luz intestinal y a las secreciones. Su vida media en los tejidos es de 4 días. Los neutrófilos presentan gránulos primarios y secundarios ricos en enzimas. Los primeros contienen enzimas hidrolíticas como la mieloperoxidasa, catalasa y lisozima. Los secundarios son ricos en lactoferrina y en proteínas catiónicas.

Los fagocitos *mononucleares* se encuentran en sangre y en tejidos; en sangre se conocen como *monocitos* y posteriormente viajan hacia los tejidos donde sufren procesos de diferenciación hasta convertirse en *macrófagos* maduros. Estos macrófagos pueden tener forma y función diferentes según el tejido en el que se encuentren, además de recibir también distintos nombres. Por ejemplo los macrófagos presentes en el pulmón se denominan macrófagos alveolares, los que se encuentran en el hígado, células de Kupffer; los de la piel, células de Langerhans, y los que colonizan el sistema nervioso central se denominan células de la microglía.

La función de los fagocitos en la *inmunidad innata*, es fagocitar partículas, microorganismos (fagocitosis) o material soluble (pinocitosis).



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Para que las células fagocíticas puedan actuar, tienen que ser atraídas al sitio de la infección. Se desplazan por los tejidos en respuesta a un gradiente de concentración de moléculas producidas en el sitio dañado; a estas moléculas se les denomina *factores quimiotácticos*, los cuales son de diversos orígenes. La quimiotaxis es vital para atraer fagocitos al sitio dañado, los neutrófilos llegan primero y posteriormente los macrófagos.

Las moléculas llamadas *opsoninas* como los componentes C3b y C5a del sistema complemento y algunos anticuerpos, éstas se adhieren al agente para que sea reconocido por los fagocitos mediante sus receptores, favoreciendo así la fagocitosis.

La fagocitosis comprende 5 fases fundamentales:

1. Quimiotaxis
2. Adherencia
3. Fagosoma
4. Fagolisosoma
5. Digestión y muerte.

Los agentes biológicos se pueden destruir dentro del fagocito por dos mecanismos:

- a) Dependientes de oxígeno
 - b) Independientes de oxígeno.
- a) Una vez englobado el agente por el fagocito se produce un estallido respiratorio, que consiste en un aumento en el consumo de oxígeno, acompañado por el incremento en la actividad de varias enzimas que inducen la generación de diversos elementos o compuestos bactericidas como son anión superóxido (O_3^-), singlete de oxígeno (O), radical hidroxilo (OH) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2).

La mieloperoxidasa contenida en los gránulos lisosomales, utiliza el peróxido de hidrógeno y iones haluro como yodo y cloro para producir hipohaluros, compuestos microbicidas más potentes que los antes mencionados.

- b) En este mecanismo la destrucción del agente se lleva a cabo por diversas enzimas tales como lisozimas, elastasas, hidrolasas, proteínas catiónicas y lactoferrina.

III. MATERIAL Y EQUIPO.

Por grupo:

- Centrífuga clínica
- Incubadora ajustada a $37^\circ C$ y 7% de CO_2
- 2 porta-cajas de Petri.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



- Resina sintética
- 100 ml de safranina al 0.5%
- 1 litro de Solución Salina (S.S.) al 0.85%
- 80 ml de Medio Esencial Mínimo (MEM) pH 6.8-7.
- 8 ml de Azul de Tetrazolium (NAT) al 0.1% en S. S. al 0.85%
- 20 ml de levaduras sin opsonizar ajustadas a una concentración de 5×10^6 levaduras/ml
- 20 ml de levaduras opsonizadas ajustadas a una concentración de 5×10^6 levaduras/ml
- 1 matraz Erlenmeyer de 125 ml
- 1 pipeta de 5 ml esterilizada
- 3 pipetas de 1 ml esterilizadas
- 2 tubos de ensaye de 13x100 mm
- frasco con torundas alcoholadas
- 2 velas
- Papel absorbente

Por equipo:

- 1 jeringa desechable de 10 ml con aguja de 22x32 mm
- 1 ligadura
- 2 cajas de Petri de 60x15 mm desechables
- 4 cubreobjetos
- 1 pipeta de 5 ml
- 1 pipeta de 1 ml
- 1 pipeta Pasteur con bulbo
- 1 matraz Erlenmeyer de 125 ml
- 1 tubo de ensaye de 16x150 ml con tapón de rosca, y 9 perlas de vidrio
- 2 portaobjetos
- 1 frasco chico de boca ancha
- 1 microscopio óptico (con objetivo de inmersión)
- 1 pinza de disección sin dientes
- 1 gradilla

IV. MÉTODO.

1. Colocar 2 cubreobjetos limpios y desengrasados en cada una de las cajas de Petri, poner papel absorbente húmedo en las tapas con la finalidad de mantener una cámara húmeda.
2. Obtener 5 ml de sangre venosa sin anticoagulante y después de retirar la aguja depositar la muestra en el tubo con tapón de rosca que contiene las perlas de vidrio. Agitar el tubo suavemente evitando la formación de espuma, hasta una completa defibrinación (durante 10 min aproximadamente). Depositar 0.4 ml de sangre



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



- desfibrinada sobre la superficie de cada uno de los cubreobjetos (evitando que la sangre salga del cubreobjetos).
3. Tapar las cajas, colocarlas en el porta-cajas de Petri e incubar durante 30 min a 37°C con tensión de CO₂.
 4. Eliminar el exceso de sangre con el papel absorbente, agregar 2 ml de S.S. en cada caja de Petri cuidando de no vaciar directamente la solución sobre las preparaciones. Mover la caja suavemente en forma rotatoria, retirar el líquido de lavado con la pipeta Pasteur; repetir el lavado hasta que no se observen residuos de sangre sobre la preparación.
 5. A dos de los cubreobjetos se les adicionan 2 ml de MEM, 0.5 ml de NAT y 1 ml de levaduras opsonizadas; a los dos restantes sólo se les agregan 2.5 ml de MEM y 1 ml de levaduras sin opsonizar.
 5. Volver a incubar las preparaciones bajo las mismas condiciones del punto 3.
 6. Retirar el líquido sobrenadante de cada una de las cajas con la ayuda de una pipeta Pasteur, cuidando de no tocar la preparación.
 7. Lavar las preparaciones bajo las mismas condiciones del punto 4.
 8. Cambiar el líquido de lavado por lo menos 5 veces.
 9. Agregar a cada cubreobjetos 0.5 ml de safranina al 0.5% durante 10 minutos.
 10. Con una pipeta Pasteur enjuagar perfectamente con agua destilada las preparaciones ya teñidas, para eliminar el exceso de colorante.
 11. Sacar los cubreobjetos (con la pinza de disección sin dientes), colocarlos en forma vertical y dejar secar al aire (teniendo el cuidado de poder distinguir el anverso y el reverso así como el tipo de levaduras que contienen los mismos) una vez secos montar los cubreobjetos con resina sintética sobre los portaobjetos limpios.
 12. Con mucho cuidado, observar en cada preparación los fenómenos de ingestión y reducción del NAT con la ayuda del microscopio óptico bajo objetivo de inmersión (100x).

Los resultados se reportan al observar las células fagocíticas endocitando levaduras y distinguir entre células que redujeron el NAT (levaduras azules en su interior) de aquellas que no lo hicieron (solamente levaduras rojas).

V. RESULTADOS.

VI. CONCLUSIONES.

VII. CUESTIONARIO.

1.- ¿Cuáles diferencias observó entre las preparaciones de levaduras opsonizadas y las que contenían levaduras sin opsonizar?

2.-Si observó diferencias; explique la razón.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 2

DETERMINACIÓN DE LINFOCITOS T Y B

I. OBJETIVO.

El alumno determinará los linfocitos T y los linfocitos B mediante la técnica de rosetas.

II. INTRODUCCIÓN.

Los *linfocitos* son las células fundamentales del sistema inmune. Durante la etapa embrionaria se originan en el saco vitelino y en el hígado, después solamente en la médula ósea para posteriormente colonizar diversas estructuras que constituyen los órganos secundarios del sistema inmune (bazo, ganglios linfáticos y tejido linfoide asociado a mucosas -MALT-).

Estos órganos son acúmulos encapsulados o difusos de linfocitos en diferentes estados de maduración y activación, además contienen células epiteliales y estromales que participan en la respuesta inmune.

Los *linfocitos* presentan varias subpoblaciones que realizan funciones distintas en el curso de una respuesta inmunitaria. Los que llegan al *timo*, se diferencian en dicho órgano y salen ya maduros como *linfocitos T*, los cuales son los responsables en gran parte de la *inmunidad celular*; existe otra subpoblación de linfocitos denominados *linfocitos B* los cuales salen ya maduros de la médula ósea y se van a diferenciar en *células plasmáticas* productoras de *anticuerpos*. Desde el punto de vista morfológico estas subpoblaciones son indiferenciables entre sí, por lo que hace algunos años su diferenciación se basaba en su resistencia a la cortisona y a su capacidad de respuesta a diversos mitógenos.

Todos los *linfocitos T* poseen en su superficie moléculas (*CD2*) que reconocen alguna sustancia presente en la membrana de los eritrocitos de carnero, por lo que si estos últimos se agregan a una población purificada de linfocitos, sólo los que sean linfocitos T quedarán cubiertos por los glóbulos rojos formando una roseta que se conoce como roseta E o roseta directa. Los *linfocitos B* también pueden formar rosetas, sólo que los glóbulos rojos de carnero tienen que estar recubiertos de anticuerpos (hemolisina) y de complemento (componente C3b) llamándolas a estas rosetas *EAC* o rosetas indirectas. Actualmente se ha demostrado que todas las células poseen moléculas en su superficie, que en algunos casos son exclusivas de una u otra población y a las que se les conoce como marcadores celulares o grupos de diferenciación (*cluster differentiation = CD*).

Mediante el uso de anticuerpos monoclonales es posible identificar a dichas moléculas. Así por ejemplo todos los *linfocitos T* maduros poseen el marcador *CD3*, los *T cooperadores* el marcador *CD4*, los *linfocitos T citotóxicos* el marcador *CD8*, etc., por lo que con anticuerpos monoclonales específicos para dichos marcadores podemos identificar los



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



linfocitos antes citados. Desgraciadamente para utilizar los anticuerpos monoclonales se requiere de un microscopio equipado con epifluorescencia ya que la técnica requiere el uso de anticuerpos marcados con isotiocianato de fluoresceína u otro compuesto fluorescente, por lo que solamente se utilizará en esta práctica la técnica de rosetas para la identificación de linfocitos.

III. MATERIAL Y EQUIPO.

Por grupo:

- Centrífuga clínica.
- Baño maría.
- Frasco con torundas alcoholadas.
- 1 litro de Solución Salina Amortiguada (S.S.A.).
- 100 ml de Alsever.
- 2 ml de heparina de 1000 UI /ml.
- 10 ml de eritrocitos de carnero al 1%
- 10 ml de eritrocitos de carnero al 5% sensibilizados con hemolisina y complemento
- 10 ml de suero humano fresco
- 10 ml de hemolisina (suero de conejo)
- 100 ml de Ficoll-Hypaque
- 500 ml de solución salina 0.85%.

Por equipo:

- 1 jeringa desechable de 10 ml
- 1 ligadura
- 2 tubos cónicos graduados en décimas de ml con tapón de rosca
- 2 tubos de ensaye de 10 x 75 mm
- 6 tubos de ensaye de 13 x 100 mm
- 4 pipetas Pasteur con bulbo
- 2 cubreobjetos
- 4 pipetas de 1 ml
- 2 pipetas de 5 ml
- 1 matraz Erlenmeyer de 50 ml
- 1 gradilla
- 1 microscopio óptico con objetivo de inmersión
- papel parafilm.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



IV. MÉTODO.

Preparación de una Población Enriquecida de Linfocitos.

1. Obtener 5 ml de sangre venosa en una jeringa conteniendo 0.1 ml de heparina a 1000 UI/ml. Mezclar bien por inversión.
2. Con la misma jeringa y sin quitar la aguja, tomar 5 ml de SSA y mezclar por inversión.
3. Estratificar la sangre diluida sobre Ficoll-Hypaque (F-H) en una proporción de 4 ml sangre con 2.5 ml F-H, en los tubos cónicos.
4. Centrifugar a 1500 rpm durante 30 min.
5. Recuperar el anillo de la interfase F-H-plasma con una pipeta Pasteur y transferir a otro tubo de ensaye de 13 x 100 mm.
6. Lavar las células con Solución Alsever por centrifugación a 1500 rpm durante 8 min.

Determinación de Rosetas E (Directas).

1. En un tubo de ensaye de 10 x 75 mm colocar 0.25 ml de la suspensión de eritrocitos de carnero al 1%.
2. Agregar 0.25 ml de la suspensión enriquecida de linfocitos y mezclar cuidadosamente.
3. Incubar a 37°C durante 15 minutos y centrifugar a 500 rpm durante 2 minutos.
4. Mantener en refrigeración durante 1 hora.
5. Aspirar con la pipeta Pasteur aproximadamente la mitad del sobrenadante procurando no agitar las células sedimentadas.
6. Con mucho cuidado, resuspender el paquete celular y tomar una gota con una pipeta Pasteur depositarla sobre un portaobjetos.
7. Colocar un cubreobjetos y observar al microscopio, utilizando el objetivo de inmersión.
8. Contar 200 linfocitos, de los cuales determinar cuantos están formando rosetas (es decir, aquellos linfocitos que tengan 3 o más eritrocitos adheridos a su superficie).
9. Mediante una regla de tres simple calcular el porcentaje de células formadoras de rosetas

200 linfocitos ----- # de linfocitos formando rosetas

100 linfocitos ----- x

Los resultados se informan como porcentaje de linfocitos formadores de rosetas. Un individuo sano debe tener 54 +/- 8% de linfocitos T.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Determinación de Rosetas EAC (Indirectas).

1. Transferir 0.25 ml de la suspensión de eritrocitos sensibilizados con hemolisina y complemento a un tubo de 10 x 75mm y agregar 0.25 ml de la suspensión enriquecida de linfocitos.
2. Centrifugar a 500 rpm durante 2 minutos y dejar reposar a temperatura ambiente durante 15 min.
3. Aspirar con la pipeta Pasteur aproximadamente la mitad del sobrenadante y agitar muy cuidadosamente el paquete celular.
4. Con una pipeta Pasteur tomar una gota de la suspensión y depositarla sobre un portaobjetos, colocar encima un cubreobjetos.
5. Observar al microscopio utilizando el objetivo de inmersión.
6. Contar 200 linfocitos, de los cuales determinar cuantos están formando rosetas (es decir, aquellos linfocitos que tengan 3 o más eritrocitos adheridos a su superficie).
7. Mediante una regla de tres simple calcular el porcentaje de células formadoras de rosetas:

200 linfocitos ----- # de linfocitos formando rosetas

100 linfocitos ----- x

Los resultados se informan como porcentaje de linfocitos formadores de rosetas. Un individuo sano debe tener 32 + / - 6% de linfocitos B.

V. RESULTADOS.

VI. CONCLUSIONES

VII. CUESTIONARIO

1. ¿Por qué los linfocitos T forman el tipo de rosetas observado?
2. ¿Por qué los linfocitos son considerados las células primordiales del sistema inmune?
3. Esquematiza la linfopoyesis:



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



ANEXO.

REACCIONES DE AGLUTINACIÓN.

Las siguientes siete prácticas tienen como factor común las reacciones de aglutinación, y hemos seleccionado las que como médico general son más frecuentemente solicitadas al laboratorio de análisis clínicos.

INTRODUCCIÓN.

Cuando la acción del anticuerpo está dirigida a antígenos presentes en la superficie de células o en las membranas de microorganismos, el anticuerpo produce la agregación de las células o de las bacterias dando lugar al fenómeno de *AGLUTINACIÓN*.

En las reacciones de aglutinación el antígeno es particulado y cuando éste reacciona con el anticuerpo se forma una malla de complejos antígeno-anticuerpo que se hace visible. Estas reacciones sólo son semicuantitativas, las ventajas son su mayor grado de sensibilidad y la facilidad para observarlas.

Las reacciones de aglutinación son ampliamente utilizadas como un método simple y rápido para identificación de bacterias, hongos y tipos de eritrocitos. En ellas intervienen varios factores inespecíficos, como el pH, la temperatura y la fuerza iónica de todo el complejo.

Estas reacciones se pueden clasificar en:

Activas o directas en las cuales, los antígenos que intervienen en la reacción son componentes naturales de la partícula (bacteria, levaduras, eritrocitos, linfocitos, etc.).

Pasivas o indirectas en las cuales, los antígenos se acoplan artificialmente a partículas que sólo funcionan como soportes. Las más utilizadas son eritrocitos y esferas de poliestireno (látex).

La aglutinación puede efectuarse en placa o en tubo y puede ser cualitativa o semicuantitativa



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



En el caso de las bacterias se lleva a cabo entre las estructuras localizadas en su superficie celular (cápsula, pared, flagelos, etc.) con la población heterogénea de anticuerpos específicos producidos previamente en el hospedero que estuvo en contacto con dicho agente. Este contacto puede establecerse en forma natural (infecciones clínicas o subclínicas) o artificiales (inmunización).

Entre las aplicaciones más importantes de la aglutinación bacteriana están la identificación y clasificación de microorganismos aislados de diversas fuentes (exudados, heridas, sangre, alimentos, aguas negras, etc.) y el diagnóstico de cuadros infecciosos mediante el hallazgo de anticuerpos específicos en el suero de pacientes, así como para seguir la evolución del proceso en aquellos en que exista una correlación entre el título de anticuerpos y el cuadro clínico.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 3

PRUEBAS CRUZADAS

I. OBJETIVO.

Que el alumno realice de manera sencilla las pruebas rutinarias utilizadas antes de una transfusión sanguínea.

II. INTRODUCCIÓN.

Las pruebas cruzadas se realizan en dos partes, la *Prueba Mayor* donde reacciona el plasma o suero del receptor con los glóbulos rojos del donador y la *Prueba Menor* donde la reacción se lleva a cabo en el plasma del donador con los glóbulos rojos del receptor.

Estas pruebas son realmente una transfusión *in vitro* en donde se aprecia la compatibilidad de la sangre o fracción de la sangre que se va a transfundir al enfermo.

Los anticuerpos se encuentran en el plasma y los antígenos en la superficie de los glóbulos rojos. En la *Prueba Mayor* se verifican los anticuerpos del paciente que se encuentran en gran volumen contra los glóbulos rojos que se van a transfundir. Cualquier incompatibilidad (aglutinación o hemólisis) anula la posibilidad de que se realice la transfusión. En la *Prueba Menor* se verifican los anticuerpos del plasma del donador que se encuentran en menor volumen contra los glóbulos rojos del receptor. Si se presenta incompatibilidad (aglutinación o hemólisis) se transfunde el paquete globular sin plasma.

En el plasma existen anticuerpos completos e incompletos, por lo cual, para detectar cualquier incompatibilidad las pruebas cruzadas deben realizarse en tres fases: *salina*, *albuminosa* y *Coombs*. La fase *salina* detecta cualquier error en el sistema ABO, así como incompatibilidades debidas a los anticuerpos: anti A, anti B, anti H, anti M, anti N, anti P y en ocasiones anti Le. Las fases *albuminosa* y *Coombs* detectan anticuerpos del sistema Rh (anti C, anti D, anti c, anti E, anti e) así como anti Kell, anti Duffy, anti Lutheran, anti Lewis, anti Kidd y anti Diego.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



III. MATERIAL Y EQUIPO

Por grupo:

- Centrífuga clínica.
- Caño maría.
- Sueros tipificadores (sistema ABO y Rh)
- Albumina bovina al 30%.
- Suero de Coombs.
- 1 litro de solución salina 0.85%.
- Papel parafilm.
- Frasco con torundas

Por equipo:

- Jeringa de 5 ml.
- Ligadura.
- 14 tubos de 13x100.
- 2 pipetas Pasteur con bulbo.
- 1 pipeta de 5 ml.
- 1 matrás de 125 ml
- 1 gradilla.
- Aplicadores de madera

IV. MÉTODO

1. Obtener 5 ml de sangre venosa sin anticoagulante tanto del donador como del receptor y colocarla en dos tubos de 13x100.
2. Centrifugar las muestras de sangre a 1500 rpm durante 5 minutos.
3. Verificar el tipo sanguíneo directo e inverso del paciente y donador, usar sueros de control.
4. Separar en tubos marcados el suero y glóbulos rojos del donador y receptor.
5. Preparar por separado una suspensión de glóbulos rojos del donador y receptor al 2% en solución salina
6. Rotular 6 tubos, siguiendo la tabla a continuación:

Tubo	Suero del receptor	Suero del donador	Glóbulos rojos del	Glóbulos rojos del	Albúmina al 30%
------	--------------------	-------------------	--------------------	--------------------	-----------------



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



R	2 gotas			1 gota	
d		2 gotas	1 gota		
AUTO	2 gotas		1 gota		
Alb	2 gotas			1 gota	2 gotas
alb		2 gotas	1 gota		2 gotas
AUTO A	2 gotas		1 gota		2 gotas

7. Mezclar cada uno de los tubos por agitación suave e incubar a la temperatura indicada

Fase *salina*:

- Los tubos R, d y AUTO, se dejan a temperatura ambiente en la gradilla durante 15 minutos.
- Se centrifugan a 3400 rpm durante 30 segundos.
- Se observa y lee resultados en cada tubo, anotar y conservar los tubos.

Fase *albuminosa*:

- Los tubos Alb, alb y AUTO A, se incuban a 37°C durante 20 minutos.
- Se centrifugan a 3400 rpm durante 90 segundos.
- Se observa y lee resultados en cada tubo, anotar y conservar los tubos.

Si las pruebas anteriores muestran que las sangres del donador y receptor son compatibles (sin aglutinación o hemólisis), continuar con la siguiente etapa.

Fase de *Coombs*.

- Los eritrocitos de los seis tubos se lavan tres veces, agregando 0.5 ml. de SSI y centrifugar a 3400 rpm durante 1 minuto cada vez
- Después del tercer lavado se retira el sobrenadante y se agrega a cada tubo una gota del suero de Coombs (ANTIGLOBULINA HUMANA).
- Se agitan los tubos suavemente.
- Centrifugar los tubos a 3400 rpm durante 30 segundos.
- Se observa y lee resultados en cada tubo.

Interpretación de resultados:



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



La aparición de aglutinación o hemólisis en un tubo, en cualquier fase, indica incompatibilidad. Debe buscarse otra sangre y realizar nuevamente las pruebas cruzadas.

Fenómeno de autoaglutinación:

Se presenta frecuentemente y puede observarse directamente en el tubo que contiene la muestra o en el momento de hacer las pruebas cruzadas pretransfusionales, observándose resultados incongruentes en el sistema ABO y/o Rh. Este fenómeno se puede presentar en: Anemias autoinmunes, Disproteinemias como el Mieloma múltiple (por hiperproteïnemia) y por anticuerpos fríos.

V. RESULTADOS.

Tubo	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado	Resultado
R					
d					
AUTO					
Alb					
alb					
AUTO A					

VI. CONCLUSIONES.

VII. CUESTIONARIO.

1. ¿Por qué deben de realizarse las pruebas cruzadas, si solo conocemos el grupo sanguíneo del donador y receptor?
2. ¿Cuándo se debe aplicar la fase de Coombs en las pruebas cruzadas?
3. ¿A qué grupos sanguíneos se les deben realizar las pruebas cruzadas hasta la fase de Coombs?



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 4

INVESTIGACIÓN DE ANTICUERPOS ANTI-Rh

I. OBJETIVO.

Que el alumno realice el diagnóstico clínico del laboratorio para investigar la enfermedad hemolítica del recién nacido por incompatibilidad del factor Rh, mediante la prueba de Coombs directa e indirecta.

II. INTRODUCCIÓN.

La enfermedad hemolítica isoimmune del recién nacido o eritroblastosis fetal, es un trastorno hemolítico inducido por transferencia transplacentaria de anticuerpos. La hemólisis resultante puede causar al producto: anemia, ictericia, insuficiencia cardíaca, eritropoyesis compensadora con derramamiento de altas cifras de hematíes nucleados en la sangre periférica. Las entidades clínicas de hidropesía fetal e ictericia la grave del recién nacido en la actualidad están agrupados bajo los términos de eritroblastosis fetal, en la cual los hematíes del recién nacido pueden ser destruidos por una reacción antígeno-anticuerpo (materno-fetal). La eritroblastosis fetal se puede por incompatibilidad ya sea del sistema Rh (D), sistema AB0 o en algunos casos por otros sistemas, como Kell, Lutheran y otros.

En la enfermedad hemolítica del recién nacido los glóbulos rojos fetales entran regularmente a la circulación de la madre, los cuales pueden ser detectados a los 3 meses de gestación; pero en una cantidad muy pequeña para que puedan sensibilizar a la madre, la transferencia transplacentaria es en mayor cantidad durante el parto. Estos eritrocitos poseen un antígeno que falta en los maternos y pueden estimular la producción de anticuerpos de la clase IgG que cruzan la placenta y entran a la circulación fetal, adhiriéndose al antígeno de los eritrocitos fetales y favoreciendo su destrucción (lisis).

El uso de la prueba de Coombs (antigammaglobulina) detecta el revestimiento de los hematíes del recién nacido por el iso-anticuerpo (IgG). Se recomienda la exanguíneo-transfusión como tratamiento de algunos casos.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



El suero de Coombs detecta una amplia gama de anticuerpos humanos que son absorbidos por la superficie de los eritrocitos humanos.

La prueba de Coombs se divide en directa e indirecta:

- a) Coombs *directa*, se utiliza para determinar la presencia de anticuerpos adheridos a los glóbulos rojos del recién nacido *in vivo*, como en los casos de eritroblastosis fetal, anemia hemolítica adquirida y reacciones hemolíticas transfusionales que son provocadas por incompatibilidad del sistema Rh.
- b) Coombs *indirecta*, se utiliza en las pruebas sanguíneas para detectar anticuerpos incompletos aglutinantes en el suero de la madre, no revelados por las pruebas ordinarias.

III. MATERIAL Y EQUIPO

Por grupo:

- Centrífuga clínica.
- Baño maría a 37°C.
- Antiseros para la determinación de grupos sanguíneos (sistema AB0 y Rh).
- Suero de Coombs (suero de conejo antigamma-globulina humana).
- 100 ml SSI (solución salina isotónica).
- 10 ml de eritrocitos de recién nacido al 1 % sensibilizados con IgG (control +).
- 10 ml de eritrocitos al 1 % no sensibilizados con IgG (control -).
- 20 ml de suero de madre Rh -.

Por equipo:

- 6 tubos de ensaye de 13 x 100 mm.
- 2 pipetas Pasteur con bulbo.
- Gradilla.
- 1 pipeta serológica de 0.1 ml.

IV. MÉTODO

Prueba de Coombs directa: Identificación de anticuerpos incompletos en los glóbulos rojos del recién nacido por incompatibilidad Rh ó AB0.

1. Colocar 1 gota de eritrocitos del recién nacido en un tubo de ensaye y lavar con SSI de la siguiente manera: agregar 0.5 ml de solución salina a 37°C, centrifugar a



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



- 1000 rpm /1 minuto y decantar. Repetir lo anterior dos veces más.
2. Añadir 2 gotas de suero de Coombs.
3. Mezclar suavemente y centrifugar a 1000 rpm por 1 minuto.
4. Observar si existe aglutinación en el fondo del tubo.

Interpretación:

Aglutinación (+): Indica que los eritrocitos del recién nacido están cubiertos por el anticuerpo incompleto.

Aglutinación (-): No hay presencia de anticuerpos de la madre en los eritrocitos del recién nacido.

Prueba de Coombs indirecta: Identificación de isoaglutininas (Ac) en el suero de la madre por incompatibilidad Rh ó ABO.

1. Marcar 2 tubos de ensaye de 13 x 100 mm con el número 1 y 2.
2. Adicionar al tubo número 1; 0.1 ml de glóbulos rojos del recién nacido al 1 % previamente lavados con SSI.
3. Adicionar al tubo número 2; 0.1 ml de glóbulos rojos al 1 % previamente lavados con SSI.
4. Adicionar al tubo número 1; 0.2 ml de suero de la madre.
5. Adicionar al tubo número 2; 0.2 ml de SSI.
6. Incubar los dos tubos 15 min. a 37°C.
7. Centrifugar a 1000 rpm/1 min y observar si existe aglutinación en el fondo del tubo. Esto se considera prueba positiva.
8. En caso de que no se observe aglutinación en ambos tubos continuar a partir del punto 9.
9. Lavar 3 veces con SSI. (Como se indica en el punto 1 de la Prueba de Coombs directa).
10. Decantar, quitar el exceso de solución salina.
11. Adicionar a cada tubo 2 gotas de suero de Coombs.
12. Incubar a 37°C por 15 min.
13. Centrifugar a 1000 rpm por 1 minuto
14. Observar si existe aglutinación en el fondo del tubo.

	TUBO 1 (CONTROL+)	TUBO 2(CONTROL-)
GLOBULOS ROJOS AL 1 %	0.1 ml.	0.1 ml.
SUERO (MADRE)	0.2 ml.	---
SOLUCIÓN SALINA ISOTONICA	---	0.2 ml.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Interpretación:

- Aglutinación en el tubo 1: indica la presencia de anticuerpos incompletos en el suero de la madre.
- No aglutinación: ausencia de anticuerpos en el suero de la madre.

V. RESULTADOS

VI. CONCLUSIONES

VII. CUESTIONARIO

1. Explica en que consiste la isoinmunización materno-fetal:
2. ¿Por qué se tiene que hacer una prueba de Coombs directa; y en quién se realiza?
3. ¿En quién se realiza la prueba de Coombs indirecta?



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 5

DETERMINACIÓN DE PROTEÍNA C REACTIVA

I. OBJETIVO.

El alumno determinará e interpretará serológicamente la presencia de la proteína C presente en procesos infecciosos o necróticos como algunas enfermedades (fiebre reumática, hepatitis, apendicitis, tuberculosis).

II. INTRODUCCIÓN

La *proteína C reactiva* es una alfa-globulina anormal que aparece rápidamente en el suero de pacientes con enfermedades inflamatorias de origen infeccioso o no infeccioso.

La reacción resulta útil para el diagnóstico y pronóstico de enfermedades como la fiebre reumática, ya que desaparece cuando cede el proceso inflamatorio, reapareciendo cuando éste se activa.

Se ha demostrado la presencia de esta proteína en el suero de pacientes durante la fase aguda de padecimientos como la fiebre reumática, tuberculosis, apendicitis, hepatitis, alteraciones de las vías urinarias, infarto del miocardio, embolia pulmonar, neoplasias y otras.

La demostración de la *proteína C reactiva* y la elevada velocidad de sedimentación eritrocitaria (VSG) cobra un mayor significado clínico, sin embargo en algunos casos se detecta más prontamente la proteína C reactiva que el aumento en la velocidad de sedimentación. Los niveles de la *proteína C reactiva* alcanzan su máximo, durante la fase aguda de la enfermedad y disminuye rápidamente cuando declina el padecimiento.

III. MATERIAL Y EQUIPO.

Por grupo:

- Centrífuga clínica.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



- Frasco con torundas alcoholadas.
- 100 ml de solución salina isotónica.
- Equipo de proteína C reactiva preferentemente marca SPINREACT.

Por equipo:

- Jeringa desechable de 5 ml.
- Ligadura.
- 5 tubos de 13x100 mm.
- Gradilla metálica.
- 2 pipetas Pasteur con bulbo.
- 1 pipeta graduada terminal de 1 ml.
- 1 pipeta graduada terminal de 0.1 ml.
- Placa de reacción.
- Aplicadores de madera.

IV, MÉTODO.

Toma de muestra:

1. Extraer 3.0 ml. de sangre venosa del paciente, retirar aguja y colocarla en un tubo sin anticoagulante.
2. Dejar coagular a temperatura ambiente (aprox. 10 min.) y centrifugar a 2000 r.p.m. /5 minutos.
3. Separar el suero con ayuda de la pipeta Pasteur en otro tubo (suero no hemolizado ni lipémico).

Nota: dependiendo de la marca del equipo utilizado se podrá realizar de la siguiente manera.

4. Atemperar el reactivo y los controles a temperatura ambiente.
5. Homogenizar el reactivo PCR látex con agitación suave.
6. Comprobar la funcionalidad del reactivo mediante los controles positivo y negativo.
7. Dosificar 50 μ l (1 gota) de suero problema a analizar en un círculo de la placa de reacción SIN DILUIR.
8. En otro círculo de la placa depositar una gota de suero control positivo.
9. En el tercer círculo depositar una gota de suero control negativo.
10. Añadir a cada círculo una gota del reactivo PCR látex, previamente resuspendido.
11. Mezclar con ayuda del aplicador de madera y extender la muestra en todo el círculo.
12. Mover la placa en forma rotatoria durante 2 min.
13. Al cabo de este tiempo observar la aparición o ausencia de aglutinación.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Interpretación:

Resultado positivo:

Presencia de aglutinación indica un nivel de PCR igual o superior a 6 mg/ l en la muestra (aglutinación comparable al control positivo).

Resultado negativo:

Ausencia de aglutinación indica un nivel de PCR inferior a 6 mg/ l en la muestra (sin aglutinación comparable al control negativo).

En caso de obtener un resultado positivo realizar la cuantificación de PCR, como se indica a continuación:

Diluciones	1/2	1/4	1/8	1/16	
Suero problema	100 µl	---	---	---	
Solución salina	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	
Pasar alícuotas de		100 µl	100 µl	100 µl	
Reactivo PCR látex	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	
Concentración si es la última dilución que da aglutinación					
6 x nº dilución	6 x 2	6 x 4	6 x 8	6 x 16	
mg / l	12	24	48	96	

Valores Normales: Adultos < 6 mg/l

V. RESULTADOS.

VI. CONCLUSIONES.

VII. CUESTIONARIO.

1. ¿Qué importancia clínica tiene este parámetro en los recién nacidos?
2. Investigar las patologías donde sea útil aplicar esta prueba diagnóstica:



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 6

DETERMINACIÓN DE ANTIESTREPTOLISINAS

I. OBJETIVO.

El alumno determinará e interpretará los resultados de éste parámetro clínico como parte de un perfil reumático, junto con la Proteína "C" reactiva y el Factor reumatoide.

II. INTRODUCCIÓN.

Cuando un agente (microorganismo) se establece en un hospedero, se comporta como antígeno que induce a la formación de anticuerpos específicos que se encuentran en el suero de individuos que han tenido contacto.

Las antiestreptolisinas son anticuerpos producidos en los organismos que padecen de infecciones repetidas por estreptococos de los grupos A, C y G (de Lancefield). Un título alto de antiestreptolisinas es un dato menor en el diagnóstico de la fiebre reumática, es decir por si solo no permite hacer el diagnóstico confirmativo, pero sí es útil en el control de la enfermedad. Una sola determinación no tiene valor significativo, la prueba debe repetirse en lapsos de dos semanas El incremento de los títulos de una determinación a otra, indica presencia de hipersensibilidad producida por infecciones estreptocócicas de repetición.

MATERIAL Y EQUIPO

Por grupo:

- Centrifuga clínica.
- Baño maría a 37°C
- Equipo para la determinación de antiestreptolisina "O".
- 250 ml solución salina amortiguadora para la determinación de antiestreptolisina "O".
- Frasco con torundas alcoholadas.
- 100 ml de una suspensión de glóbulos rojos lavados al 5% (usar sangre humana tipo O Rh+ fresca y defibrinada).

Por equipo:



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Vol.	0.2	0.8	0	0.2	0.4	0.6	0.7	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.5	1.0
CCA	AGITAR TODOS LOS TUBOS													
Vol.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0	0.5
EST.	AGITARE INCUBARA 37° C DURANTE 15 MINUTOS													
Vol.	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5
C.P.	AGITAR E INCUBAR A 37° C DURANTE 45 MINUTOS TENIENDO CUIDADO DE AGITAR LOS TUBOS CADA 15 MINUTOS Y AL FINAL CENTRIFUGAR A 1500 rpm / 1 MINUTO.													
U.	12	50	100	125	166	250	333	500	625	833	1250	2500		
Todd														

Interpretación:

El título de antiestreptolisina "O", se expresa en unidades Todd. Estas unidades son la recíproca de la dilución más alta del suero que neutraliza completamente a la estreptolisina "O".

Valores para esta técnica:

Normales < 125 Unidades Todd.

Dudoso de 166 a 333 Unidades Todd.

Significativo > 500 Unidades Todd.

V. RESULTADOS.

VI. CONCLUSIONES.

VII. CUESTIONARIO.

1. ¿Qué importancia clínica tiene este parámetro?
2. Investigar las patologías donde sea útil solicitar esta prueba diagnóstica:
3. ¿Por qué las infecciones de repetición por estreptococos del grupo "A" desencadenan procesos de hipersensibilidad?



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 7

DETERMINACIÓN DE FACTOR REUMATOIDE

I. OBJETIVO.

El alumno realizará la comprobación o exclusión de factores reumatoides en suero de pacientes con artritis reumatoide mediante una prueba serológica de aglutinación con partículas de látex.

II. INTRODUCCIÓN.

Entre los anti-anticuerpos que pueden encontrarse en el humano se cuentan los factores reumatoides. El factor reumatoide es un anticuerpo circulante que reacciona con algunos componentes de inmunoglobulinas, la producción de dicho factor es resultado de la respuesta por parte del individuo hacia uno o más determinantes antigénicos específicos presentes en sus propias gammaglobulinas. Este factor está constituido por inmunoglobulinas con especificidad para el fragmento Fc de IgG.

En la artritis reumatoide los niveles séricos de factor reumatoide guardan correlación precisa con la aparición de nódulos subcutáneos, la presencia de artritis deformante y el ataque generalizado de la enfermedad.

El factor reumatoide no es específico de dicha enfermedad, ya que se presenta con títulos no demsiados elevados en pacientes afectados de lupus eritomatoso, sarcoidosis, tuberculosis, lepra, hepatitis, cirrosis, sífilis y aún en individuos sanos. *En la fiebre reumática los factores reumatoides están casi siempre ausentes.*

III. MATERIAL Y EQUIPO.

Por grupo:

- Centrífuga clínica.
- Frasco con torundas alcoholadas.
- 100 ml de solución salina isotónica.
- Equipo para determinación de Factor Reumatoide preferentemente marca SPINREACT.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Por equipo:

- Jeringa desechable de 5 ml.
- Ligadura.
- 5 tubos de 13x100 mm.
- 1 gradilla metálica.
- 2 pipetas Pasteur con bulbo.
- 1 pipeta graduada terminal de 1 ml.
- 1 pipeta graduada terminal de 0.1 ml.
- Placa de reacción.
- Aplicadores de madera.

IV. MÉTODO.

Toma de muestra:

1. Extraer 3.0 ml de sangre venosa del paciente, retirar aguja y colocarla en un tubo sin anticoagulante.
2. Dejar coagular a temperatura ambiente (aprox. 10 min.) y centrifugar a 2000 r.p.m. / 5 minutos.
3. Separar el suero con ayuda de la pipeta Pasteur en otro tubo (suero no hemolizado ni lipémico).

Nota: dependiendo de la marca del equipo utilizado se podrá realizar de la siguiente manera.

4. Atemperar el reactivo y los controles a temperatura ambiente.
5. Homogenizar el reactivo FR-látex con agitación suave.
6. Comprobar la funcionalidad del reactivo mediante los controles positivo y negativo.
7. Dosificar 50 μ l (1 gota) de suero problema a analizar en un círculo de la placa de reacción SIN DILUIR.
8. En otro círculo de la placa depositar una gota de suero control positivo.
9. En el tercer círculo depositar una gota de suero control negativo.
10. Añadir a cada círculo una gota del reactivo FR-látex, previamente resuspendido.
11. Mezclar con ayuda del aplicador de madera y extender la muestra en todo el círculo.
12. Mover la placa en forma rotatoria durante 2 min.
13. Al cabo de este tiempo observar la aparición o ausencia de aglutinación.

Interpretación:

Resultado positivo:

Presencia de aglutinación indica un nivel de FR igual o superior a 8 UI/ml en la muestra (aglutinación comparable al control positivo).



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Resultado negativo:

Ausencia de aglutinación indica un nivel de FR inferior a 8 UI/ml en la muestra (sin aglutinación comparable al control negativo).

En caso de obtener un resultado positivo realizar la cuantificación de FR, como se indica a continuación:

Diluciones	1/2	1/4	1/8	1/16	
Suero problema	100 µl	----	----	---	
Solución salina	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	
Pasar alícuotas de		→ 100 µl	→ 100 µl		
Reactivo PCR látex	50 µl	50 µl	50 µl	50 µl	
Concentración si es la última dilución que da aglutinación					
8 x nº dilución	8 x 2	8 x 4	8x8	8x16	
mg / l	16	32	64	128	

Valores Normales: Adultos < 8 UI/ml

V. RESULTADOS.

VI. CONCLUSIÓN.

VII. CUESTIONARIO.

1. ¿Qué importancia clínica tiene este parámetro?
2. Investigar las patologías donde sea útil solicitar esta prueba diagnóstica:
3. Explique las ventajas y desventajas de esta determinación en la práctica médica.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 8

REACCIONES FEBRILES

I. OBJETIVO.

El alumno interpretará correctamente el diagnóstico de enfermedades febriles como la fiebre tifoidea, paratifoidea, tifo epidémico y brucelosis, mediante reacciones de aglutinación.

II. INTRODUCCIÓN.

Las reacciones febriles, son de valor en el diagnóstico de infecciones como la fiebre tifoidea (*Salmonella typhi*), paratifoideas (*Salmonella enteritidis*, *S. paratyphi* A y B), tifo epidémico (*Rickettsia prowazekii*) y brucelosis o fiebre de malta (*Brucella sp*).

Estas reacciones se encuentran compuestas por tres:

- ✓ R. de Widal utilizada para el diagnóstico de fiebre tifoidea y paratifoideas.
- ✓ R. de Huddleson empleada en brucelosis.
- ✓ R. de Weil-Felix en tifo epidémico.

El fundamento de las reacciones se basa en la demostración de anticuerpos específicos presentes en el suero del paciente para los antígenos de los agentes causales. Solo para el caso de las especies de *Rickettsia* causantes del tifo epidémico se utilizan componentes antigénicos de *Proteus* (OX-19, OX-2 y OX-K), dado que cruzan antigénicamente.

Clínicamente en las infecciones por *Salmonella* se presentan tres síndromes principales: gastroenteritis (la forma más común), fiebre tifoidea y septicemia. La brucelosis es una enfermedad aguda o crónica que se manifiesta principalmente por fiebre, escalofríos y debilidad, ocasionalmente los episodios febriles son ondulatorios por lo que la enfermedad a recibido el nombre de fiebre ondulante. En el caso de tifo epidémico los agentes etiológicos muestran predilección por las células endoteliales, lo que da lugar a la característica lesión cutánea primaria y la vasculitis, esta enfermedad puede ocasionar recaídas a largo plazo de 10 a 20 años después de una aparente recuperación (enfermedad de Brili Zinsser).

III. MATERIALES Y EQUIPO.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Por grupo:

- Centrífuga clínica.
- Frasco con torundas alcoholadas.
- Equipo completo para determinar Reacciones Febriles (Febriclin)

Por equipo:

- 1 jeringa desechable de 5 ml.
- 1 ligadura.
- 2 tubos de 13x100 mm.
- 1 gradilla metálica.
- 1 pipeta Pasteur con bulbo.
- 1 pipeta graduada terminal de 0.1 ml.
- 1 placa excavada para aglutinación.
- Aplicadores de madera.

IV. MÉTODO.

Toma de muestra:

1. Extraer 5.0 ml de sangre venosa del paciente, retirar aguja y colocarla en un tubo con anticoagulante.
2. Dejar coagular a temperatura ambiente (aprox. 10 min.) y centrifugar a 2000 r.p.m. /5 minutos.
3. Separar el suero con ayuda de la pipeta Pasteur en otro tubo (suero no hemolizado ni lipémico).

Proceder de la siguiente manera:

A) Prueba cualitativa

1. En la placa excavada marcar o anotar el antígeno correspondiente en cada círculo.
2. Medir 0.04 ml de suero del paciente y colocar en cada uno de los círculos de la placa.
3. Adicionar en cada círculo 1 gota de los diferentes antígenos. Mezclar con un aplicador y mover la placa en forma rotatoria durante 2 min. Observar frente a una fuente de luz directa la presencia de aglutinación en cada uno de los círculos.
4. En los antígenos en los que se presente la aglutinación deberá realizarse la prueba cuantitativa (cuantificación del título de anticuerpos o de aglutininas).

B) Prueba cuantitativa

1. En la placa excavada marcar o anotar las diluciones del suero correspondientes a cada



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



- círculo. 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320.
2. Medir y colocar en el siguiente orden las cantidades de suero del paciente 0.08, 0.04, 0.02, 0.01 y 0.005 ml respectivamente.
 3. Adicionar en cada círculo 1 gota del antígeno a cuantificar. Mezclar con un aplicador y mover la placa en forma rotatoria durante 2 min. Observar frente a una fuente de luz directa la presencia de aglutinación en cada uno de los círculos.

Interpretación:

El título de aglutininas corresponde a la máxima dilución donde se presente aglutinación.

Resultado negativo: títulos menor o igual de 1:40.

Dudoso: título de 1:80.

Resultado positivo: títulos mayor o igual de 1:160.

Nota: como en sueros normales puede haber aglutininas de tipo variable, la reacción de aglutinación positiva tiene poco valor, para que los resultados adquieran significado se debe 'a' repetir varias veces la prueba para demostrar un aumento del título durante el curso de a infección:

V. RESULTADOS.

VI. CONCLUSIONES.

VII. CUESTIONARIO.

Los resultados de un paciente son los siguientes, interprételos clínicamente: tífico "O" 1:40, tífico "H" 1:160 y los demás antígenos negativos.

Los resultados de un paciente son los siguientes, interprételos clínicamente: *Proteus* OX-19, 1:320 y los demás antígenos negativos.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



PRÁCTICA 9

PRUEBA INMUNOLÓGICA DE EMBARAZO

I. OBJETIVO.

Que el alumno al finalizar esta práctica pueda interpretar la prueba de embarazo, mediante la detección de Gonadotropina coriónica humana (hCG).

II. INTRODUCCIÓN

Desde la etapa más temprana del desarrollo (9 días de edad), la placenta produce hormonas, ya sea por sí sola o en conjunto con el feto. Los trofoblastos placentarios muy jóvenes producen cantidades apreciables de hormona gonadotropina coriónica humana (hCG) que es excretada por la orina. Los niveles urinarios aumentados de hCG forman la base de la mayor parte de las pruebas para embarazo y otras patologías tanto en la mujer como en el hombre.

Todas las pruebas de embarazo están encaminadas para descubrir hCG; ésta se encuentra en sangre y en orina siempre que hay un tejido canónico.

En esta práctica la prueba está basada en una reacción de aglutinación en látex directa, utilizando las partículas recubiertas con anti hCG. La hCG que se puede descubrir en la orina de mujeres embarazadas después de 26 a 36 días contados a partir del primer día del último periodo menstrual, u 8 a 10 días después de la concepción. La orina se mezcla con el reactivo y los anticuerpos reaccionarán con la hormona para formar un patrón de aglutinación de látex granulosa (reacción positiva). Si la hCG no se encuentra en la orina no se producirá aglutinación al mezclarla con el reactivo (reacción negativa). Las pruebas de embarazo deben ser negativas 3 a 4 días después del parto. Las nuevas pruebas en orina son tan exactas y sensibles como las hechas en suero.

III. MATERIAL Y EQUIPO.

Por grupo:

- Un equipo para diagnóstico de embarazo preferentemente marca Neo-Planotest.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



Por equipo:

Muestra de orina problema (de preferencia la primera de la mañana) por contener la mayor concentración de hCG.

IV. MÉTODO.

1. Colocar la placa sobre una superficie horizontal.
2. Agitar suavemente el reactivo de látex durante 15 segundos para obtener una suspensión homogénea (no es necesario temperar).
3. Aspirar con la pipeta la cantidad suficiente de reactivo y transferir 25 μ l (una gota) cayendo libremente sobre el círculo de la placa.
4. Devolver el reactivo restante de la pipeta al frasco original.
5. Utilizando la misma pipeta aspirar la muestra de orina y transferir 50 μ l (2 gotas) cayendo libremente sobre la misma área de prueba.
6. Mezclar con la espátula el reactivo y la orina esparciendo la mezcla sobre toda el área de prueba.
7. Balancear suavemente la placa dejando que el líquido fluya lentamente durante 2 min.
8. Colocar la placa sobre una superficie horizontal bien iluminada para hacer la lectura.

Leer e interpretar resultados.

Reacción positiva: viene indicada por la producción de una aglutinación de látex granulosa y roja, en el plazo de 2 min.

Reacción negativa: corresponde a que la suspensión de látex se mantiene uniforme al final del período de 2 min.

Nota: en el caso de muestras de orina conteniendo bajas concentraciones de hCG, o muestras negativas, el balanceo debe continuarse por 2 min. más.

V. RESULTADOS.

VI. CONCLUSIONES.

VII. CUESTIONARIO.

1. ¿En qué período del embarazo ocurre la máxima producción de hGC?



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



2. ¿En qué se basa la prueba inmunológica del embarazo utilizada?
3. En ausencia de embarazo, ¿en qué otros padecimientos se produce hGC?
4. ¿La prueba inmunológica de embarazo está indicada en la mujer que se encuentra en período de amenorrea? ¿Por qué?



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



BIBLIOGRAFÍA

- Stites, D. P., Stobo, J. D., Fudenberg, H. H., Wells, J. V. (1998). *Basic and Clinical Immunology* (9a ed.). New York: Lange.
- Barret, J. T. (1993). *Inmunología Médica*. México: Interamericana, Mac Graw-Hill.
- Regueiro, J. R., López, L.C. (1996). *Inmunología, Biología y Patología del Sistema Inmune* (2a ed.). México: Médica Panamericana.
- Warner, N. L., Fahey, J. L. (1986). *Manual of clinic laboratory immunology* (3rd ed.). New York: American Society for Microbiology.
- Mims, C. A., Pfayfair, J., Roitt, I. M., Wakelin, D. (1995). *Microbiología Médica*. Madrid: Mosby / Doyma Libros.
- Ortíz, O. L. (1987). *Inmunología*. México: Interamericana.
- Hudson, L. and Hay, F.C.; (1989). *Practica) immunology*. 3rd. Edition. Blackwell Scenyific Publications, London.
- Stites, D. P., Abbas, I. T., Tristram, G. P. (1996). *Inmunología básica y clínica* (8a ed.). México: El Manual Moderno.
- Weir, D. M., Stewart, J. (1995). *Inmunología* (2a ed.). México: El Manual Moderno.
- Warren L., Jawetz, E. (1992). *Microbiología e Inmunología Médicas*. México: El Manual Moderno.
- Albarrán, C., Albarrán, B. L. (1985). *Manual técnico del banco de sangre*. México: La Prensa Médica Mexicana.
- Rojas, E. (1996). *Inmunología de memoria*. México: Médica Panamericana.
- Zambrano, V. S. A. (1998). *Manual de inmunología básica y clínica*. México: JGH editores.
- García, G. M., Rosas, L.V. (1999). *Inmunología básica para estudiantes de medicina*. México: Instituto Politécnico Nacional.
- Fischbach, F.T. (1991). *Manual de pruebas diagnósticas* (Tomo I, II, III y IV) (3a. ed.). México: Interamericana / Mc. Graw-Hill.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



ANEXO

● Solución Salina Regulador de Boratos pH 8.4

Amortiguador de Boratos:

ácido bórico	6.184 g
bórax (tetraborato de sodio .10 H ₂ O)	9.536 g
cloruro de sodio	4.384 g
agua destilada	aforar a 1000 ml

Si es necesario ajustar el pH con soluciones diluidas de HCl o de NaOH.

Salina Boratos:

Mezclar 95 partes de solución salina al 0.85% con 5 partes del regulador de boratos.

● Solución Saturada de Sulfato de amonio

Pesar 100 g de sulfato de amonio y agregar 100 ml de agua destilada. Calentar sin que llegue a hervir de modo que se disuelva la mayor parte. Dejar enfriar y guardar a 4° C.

● Regulador de barbituratos 0.1 M pH 8.6.

Barbiturato de sodio 0.1 M	500.5 ml
HCl 0.1 M	149.5 ml
Agua destilada	350 ml

● Solución Salina Regulador de Trietanolamina, pH 7.4 (solución 10x)

NaCl	75 g
Cloruro de Magnesio	1 g
Cloruro de Calcio	0.22 g
Trietanolamina	28 ml
Agua destilada	800 ml

Añadir ácido clorhídrico 1 N para ajustar el pH a 7.4 y agregar agua destilada hasta aforar a 1000 ml.

Para usarse, diluir 1:10 con agua destilada y añadir gelatina a una concentración final del 0.05%.

● Ficoll-Hypaque.

10 partes de diatrizoato de sodio (Hypaque) al 34% y 24 partes del Ficoll 400 al 9% en



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



agua destilada. La densidad se ajusta con un picnómetro a 1.077 +/- 0.001 g/ml .
Esterilizar en autoclave a 121° C durante 15 minutos.

• Solución Salina Amortiguada (SSA) pH 7.4.

Solución A:

NaCl	8 g
KCl	0.4 g
Mg SO ₄ 7H ₂ O	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	0.045 g
KH ₂ PO ₄	0.060 g

Disolver en 500 ml de agua destilada.

Solución B:

CaCl ₂ 2H ₂ O	0.147 g
-------------------------------------	---------

Disolver en 500 ml de agua destilada.

Solución C:

Glucosa	1.06 g
---------	--------

Disolver en 10 ml de agua destilada y mezclar con 500 ml de solución A + 500 ml de solución B.

Solución D:

Rojo de Fenol	0.02 g
---------------	--------

Disolver en 10 ml de agua destilada y añadir a la mezcla A+B+C.

Solución E:

Tris; hidroximetil-aminometano	19.1 g
--------------------------------	--------

Disolver en 800 ml de agua destilada y ajustar el pH a 7.4 con HCl 0.1 N. Aforar a 1000 ml con agua destilada. Mezclar volúmenes iguales de las solución E y de la solución A+B+C+D, y reajustar el pH a 7.4 si es necesario. Esterilizar en autoclave a 110° C durante 15 minutos.

• Solución de Alsever.

Glucosa	20.5 g
Citrato de Sodio dihidratado	8.0 g
Ácido Cítrico monohidratado	0.55 g
NaCl	4.2g
Agua destilada	aforar a 1000 mI

Esterilizar en autoclave a 110 ° C durante 15 minutos.



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA NACIONAL DE MEDICINA Y HOMEOPATIA

SUBDIRECCION ACADEMICA

Departamento de Formación Básica Disciplinaria

Academia de Fisiológicas



- **Medio Esencial Mínimo (MEM) 10X.**

MEM en polvo	9.53 g
Agua bidestilada hasta	100 ml

- **Solución Salina de fosfatos (PBS) 0.1 M pH 7.4.**

Cloruro de sodio	8.0 g
Fosfato dibásico de potasio	0.2 g
Fosfato básico de sodio x 12 H ₂ O	2.9 g
Cloruro de potasio	0.2 g
Agua bidestilada hasta	1,000 ml
Ajustar el pH a 7.4.	

- **Pasta Depilatoria.**

Almidón	12g
Óxido de Zinc	7 g
Sulfuro de bario	6 g

Agregar unas gotas de agua destilada a unos 40° C y mezclar hasta obtener una masa pastosa.