	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	SERVICIO DE LABORATORIO (SEROLOGIA)	1 DE 3
	PROCEDIMIENTO: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIESTREPTOLISINA "O" MICROMETODO	CODIGO

1. GENERALIDADES

Los estreptococos beta hemolíticos de los grupos A, C, G, secretan una enzima que es la estreptolisina "O", la cual en su forma reducida presenta actividad hemolítica. Esta estreptolisina provoca la formación de anticuerpos anti-estreptolisina "O" (ASTO) en el organismo que pueden ser detectados mediante exámenes de laboratorio en muestras de suero.

2. MUESTRA

Suero fresco descartar las muestras turbias, bemozadas ó contaminadas. Se puede mantener también refrigerado de 2 a 8 grados centígrados por lapso de 5 días.

2. MÉTODO

Prueba de la inhibición de la hemólisis (micro método).

3. FUNDAMENTO

Detección de anticuerpos antiestreptolisina "O" mediante la inhibición o neutralización de la hemólisis.

Tabla N° 1: Detección de Anticuerpos, Antiestreptolisina "O" Micrométodo

EQUIPO	MATERIAL	REACTIVOS
<ul style="list-style-type: none"> - Centrifuga. - Incubadora a 37 Oc. - Cronometro. - Rotador ó agitador humano. 	<ul style="list-style-type: none"> - Micro placas. - Pipetas de 2, 5 y 10 ml. - Micro pipetas de 100 y 200 ml. - Puntas y gradilla. - Tubos de hemólisis. 	<ul style="list-style-type: none"> - Estreptolisina "O" titulada (lío filizada). - ASTO ph 6,5 a 6,7. - Hematíes de conejo ó humano el grupo O. - Lavandina.


FUENTE: Elaborado por Laboratorio Clínico, "Detección de Anticuerpos, Antiestreptolisina "O" Micrométodo", SSU, 2010.

4. PROCEDIMIENTO

A. Suspensión de hematíes: Sangre total de conejo ó humana del grupo O. Se lavara esta sangre 3 veces por centrifugación a 2000 rpm de 3 a 5 minutos descartando el sobrenadante.

El último centrifugado será de 15 minutos. Como disolución de lavado se recomienda el tampón de fosfato isotónico PH 6.5.

Del paquete globular de la última centrifugada se toman 0,3 ml y suspender en 9,7 ml de disolución de tampón fosfato PH 6.5.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	SERVICIO DE LABORATORIO (SEROLOGIA)	2 DE 3
	PROCEDIMIENTO: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIESTREPTOLISINA "O" MICROMETODO	CODIGO

B. Diluciones del suero:

En tubos de vidrio preparar las diluciones de los sueros problemas (de acuerdo a inserto), ejemplo:

- Dilución 1/10: 0,2 ml de suero + 1,8 ml de tampón ASTO.
- Dilución 1/25: 0,1 ml de suero + 2,4 ml de tampón ASTO.

1.- Identificar 2 filas con la letra A Y B (se necesita 16 posillos por muestra: 8 en la primera fila y 8 en la segunda fila) y dispensar 50 ul de tampón en cada posillo de las 2 filas de la placa.

2.- Añadir 50 ul de la dilución 1/10 al primer posillo de la fila A.

3.- Añadir 50 ul de la dilución 1/25 al primer posillo de la fila B.

4.- A partir del primer posillo efectuar sucesivas diluciones con la ayuda de un microdiluidor, por pases de 50 ul (dejar el ultimo posillo de cada fila para control).

5.- Añadir 25 ul de disolución de estreptolisina O hidratada a todos los posillos excepto en el ultimo de la fila B.

6.- Agitar suavemente é incubar por 15 minutos a 37 grados centígrados.

7.- Añadir 25 ul de suspensión de hematíes al 3% a cada posillo.

8.- Agitar suavemente e incubar 45 minutos a 37 grados centígrados, agitando después de los primeros 15 minutos.

9.- Centrifugar a 1000-1500 rpm 2 minutos o dejar sedimentar durante unos 50 a 60 minutos a temperatura ambiente.

5. LECTURA E INTERPRETACIÓN


Considerando que los últimos pocillos de la segunda fila corresponden a testigo de hematíes y testigo de estreptolisina respectivamente procederemos a leer de la siguiente manera:

- Testigo hematíes = ausencia de hemólisis.
- Testigo estreptolisina = hemólisis total.

Si ambos testigos presentan lecturas correctas, proceder a la lectura de las muestras problema:

- Presencia de anticuerpos antiestreptolisina "O" = ausencia de hemólisis.
- Ausencia de anticuerpos antiestreptolisina "O" = hemólisis total.

El título de los sueros corresponde a la inversa de la mayor dilución que no presentan hemólisis.

	MANUAL DE NORMAS Y PROCEDIMIENTOS	PAG. No:
	SERVICIO DE LABORATORIO (SEROLOGIA)	3 DE 3
	PROCEDIMIENTO: DETECCIÓN DE ANTICUERPOS ANTIESTREPTOLISINA "O" MICROMETODO	CODIGO

El valor normal es igual o menor a 166-250 unidades Todd. Un nivel superior indica una infección reciente.

6. CONTROL DE CALIDAD

Tomar en cuenta que para cada corrida de cada muestra se debe incluir un testigo de hematíes y un testigo de estreptolisina.

Hematíes: 25 ul de tampón + 25 ul de suspensión de hematíes 3% (fila B).

Estreptolisina O: 25 ul de estreptolisina hidratada + 25 ul de suspensión de hematíes al 3% (fila A).

7. LIMITACIONES DEL MÉTODO

En algunos casos aislados puede ocurrir que, aun en la evidencia de una infección estreptocócica, los resultados del test den valores inferiores a lo esperado. En este caso, se recomienda efectuar otras pruebas.

Sueros con un alto contenido en lipoproteínas, así como muestras contaminadas, pueden dar lugar a valores anormales elevados.