

PROCESAMIENTO DE MUESTRAS DE SANGRE PARA ESTUDIOS SEROLÓGICOS VIRALES

Autora Lic. Ada Lidia López Suárez

Departamento Microbiología

CONTENIDO

- Detección de anticuerpos IgM contra citomegalovirus (IgM CMV)
- Detección de anticuerpos IgG contra citomegalovirus (IgG CMV)
- Detección de anticuerpos IgM contra el virus de Epstein Barr (IgM EBV)
- Detección de anticuerpos IgG contra el virus Epstein Barr (IgG EBV)
- Detección de anticuerpos IgM contra herpes simple (IgM HSV)
- Detección de anticuerpos IgM contra Toxoplasma gondii (IgM Toxo)
- Detección de anticuerpos IgG contra Toxoplasma gondii (IgG Toxo)
- Detección de antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg)
- Detección de anticuerpos contra el virus de la hepatitis C (HCV)
- Detección de anticuerpos contra virus de la inmunodeficiencia humana (HIV)

EQUIPOS, MATERIALES Y REACTIVOS

Equipos

- Centrífuga
- Lector de ELISA, longitud de onda 450 nm
- Sistema de aspiración/lavado conectado a un contenedor de desechos y una fuente de vacío.

Materiales

- Agua destilada o desionizada.
- Pipetas Pasteur de 10, 20, 100 y 1 000 µL
- Pipeta multicanal 200 µL
- Papel de filtro
- Tubos de 13 x 100

- Probeta de 100 mL
- Cronómetro
- Guantes desechables
- Puntas desechables para dispensar 10, 20, 100 y 1000 µL
- Recipiente en forma de V
- Vial desechable para la preparación del sustrato.
- Solución de hipoclorito de sodio (0.5 %) u otro desinfectante aceptable.
- Contenedores de desechos biológicamente peligrosos para materiales potencialmente contaminados

Reactivos

- Control negativo
- Control positivo
- Buffer de dilución
- Solución de trabajo
- Conjugado
- Solución TMB
- Solución de parada (ácido sulfúrico)

TÉCNICA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS IgM CONTRA CITOMEGALOVIRUS (IgGM CMV)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgM contra el citomegalovirus.

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infecciones por herpes virus y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de estas infecciones que sean solicitadas por el médico de asistencia.

Definiciones

- El CMV perteneciente a la familia herpes viridae, es un problema potencial para todos los inmunodeprimidos ya que es una de las causas más comunes de infección oportunista refractaria, complica el trasplante de órganos y constituye una de las causas más frecuentes de infección viral prenatal. Este virus es altamente especie específico, el hombre es el único reservorio.

Establece infecciones latentes en glándulas secretorias, células linforeticulares, riñones y otros tejidos.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Señalados anteriormente.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2...8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- Se trata de un ELISA para la determinación de anticuerpos del tipo IgM contra el virus de citomegalovirus. La prueba se basa en tiras cubiertas con antígenos purificados de CMV. Si en la muestra del paciente hay presencia de anticuerpos específicos, estos se unen a los antígenos que cubren la fase sólida. El buffer de dilución de la muestra contiene IgG antihumana, para **prevenir la interferencia del factor reumatoideo y la competencia con los IgG específicas presentes en la muestra.** Después de los pasos de lavado en que se elimina el material que no se ha unido, se añade conjugado anti-IgM (anticuerpos anti-IgM humana, marcados con peroxidasa) anti IgM humana, la cual se une a los anticuerpos IgM, formándose el complejo:

CMV Ag + anti CMV IgM + anti IgM Ac humanos

Después de un segundo paso de lavado, donde se remueve todo el conjugado que no se ha unido, el complejo enzimático se detecta por incubación con TMB/Sustrato y por el desarrollo de color azul, que cambia a amarillo cuando se detiene la reacción al añadir ácido sulfúrico. Posteriormente se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM en el espécimen.

Los resultados de las muestras de pacientes se obtienen por comparación con un valor de corte.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- Se diluye el suero del paciente 1+100 con buffer de dilución (1)

Por ejemplo: 10 µL de suero + 1 mL de buffer de dilución (1). Mezclar vigorosamente y esperar 5 min. antes de comenzar la prueba.

Preparación de los reactivos

- ***Solución de lavado de trabajo (3 a)***

- ⊕ Diluir la solución de trabajo (3) 1 + 20 con agua estéril
- ⊕ Por ejemplo: 50 mL (3) + 1 000 mL (agua)= 1050 mL

Controles

- Los controles suministrados en el *Kit* están listos para usar y no requieren dilución.
- La distribución de las muestras y los controles se debe realizar lo mas rápido posible, y en el caso en que este paso exceda los 5 min., se deben distribuir primero 50 % de las muestras, seguidos los controles y después continuar con el resto de las muestras diluidas.
- Colocar la tira de pocillos en la gradilla, correctamente rotulada.

Pasos de la prueba

Paso 1

- ⊕ Dejar el pozo A1 para sustrato blanco. Pipetear los controles y las muestras como sigue:
 - 100 µL de control negativo (tapa verde) en los pozos B1/C1
 - 100 µL de control positivo (tapa roja) en los pozos D1/E1
 - 100 µL de muestras diluidas en el resto de los pozos
- ⊕ Cubrir las tiras con sellador
 - Incubar 30 min. a temperatura ambiente (17....25°C)
 - Aspirar el contenido de los pozos y descartar en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % y añadir a cada pozo 400 µL de solución de lavado, incubar de 15 a 30 segundos y aspirar de nuevo. Hacer 4 ciclos de lavado y entre vaciado y llenado golpear las tiras contra papel de filtro, para eliminar el líquido que quede.

Paso 2

- ⊕ Distribuir 100 uL de conjugado anti-IgM en todos los pozos, excepto en el sustrato blanco (A1)

- ⊕ Cubrir con sellador
- ⊕ Incubar 30 minutos temperatura ambiente (17.... 25° C).
- ⊕ Lavar las tiras 5 veces tal y como se describe en el paso 1 No 4

Paso

- ⊕ Distribuir 100 µL de solución de trabajo TMB (4 a) en todos los pozos.
- ⊕ Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
- ⊕ Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de solución de detención de la reacción a todos los pozos.
- ⊕ Calibrar a cero el equipo de Elisa con el sustrato blanco en el pozo A1.
- ⊕ Medir la absorbancia a 450 nm (A 450)

Las tiras deben ser leídas dentro de los siguientes 30 minutos

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte

Media de los controles negativos:

$$\text{MNC} = \frac{\text{B1} + \text{C1}}{2}$$

Media de los controles positivos:

$$\text{MCP} = \frac{\text{D1} + \text{E1}}{2}$$

El valor de corte se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{COV} = \text{MCN} + 0.2 \times \text{MCP}$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

- ⊕ El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150
- ⊕ MCN ≤ 0.250
- ⊕ MCP ≥ 0.400
- ⊕ MCP : MCN ≥ 3

Interpretación de los resultados

- ⊕ A 450 (pcte) ≥ COV + 15 % : Positivo
- ⊕ A 450 (pcte) < COV – 15 %: Negativo.

Si no se cuenta con un lector de Elisa es posible realizar una interpretación visual de los resultados:

- El sustrato blanco en el pozo A1 debe ser incoloro.

- Una muestra se considera **positiva** si el color del pozo de la misma es definitivamente mas fuerte que el color en los pozos de los controles negativos B1/C1.

TÉCNICA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS IgG CONTRA CITOMEGALOVIRUS (IgG CMV)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgG contra el citomegalovirus.

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infecciones por herpes virus y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de estas infecciones que sean solicitadas por el médico de asistencia.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2....8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- La prueba se basa en tiras cubiertas con antígenos de CMV derivados de cultivos celulares del virus. Si en la muestra del paciente hay presencia de anticuerpos específicos, estos se unen a los antígenos que cubren la fase sólida. El buffer de dilución de la muestra contiene IgG antihumana, para prevenir la interferencia del factor reumatoideo y la competencia con los IgG específicas presentes en la muestra. Después de los pasos de lavado en que se elimina el material que no se ha unido, se añade conjugado de anti-IgG (anticuerpos anti-IgG humana, marcados con peroxidasa) la cual se une a los anticuerpos IgG, lo que resulta en la formación de un complejo.

CMV Ag + anti CMV IgG + anti IgG Ac humanos

- Después de un segundo paso de lavado, donde se remueve todo el conjugado que no se ha unido, el complejo enzimático se detecta por

incubación con sustrato TMB y por el desarrollo de color azul, que cambia a amarillo cuando se detiene la reacción al añadir ácido sulfúrico. Posteriormente se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG en el espécimen.

- Los resultados de las muestras de pacientes se obtienen por comparación con un valor de corte, o por expresión en *Human Units*, basados en el control positivo.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- Se diluye el suero del paciente 1+100 con buffer de dilución (1)

Por ejemplo: 10 µL de suero + 1 mL de buffer de dilución (1). Mezclar vigorosamente y esperar 5 min. antes de comenzar la prueba.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado de trabajo (3 a)

- Diluir la solución de trabajo (3) 1 + 20 con agua estéril
- Por ejemplo: 50 mL (3) + 1 000 mL (agua)= 1 050 mL

Controles

- Los controles suministrados en el Kit están listos para usar y no requieren dilución.
- La distribución de las muestras y los controles se debe realizar lo más rápido posible, y en el caso en que este paso exceda los 5 min. se deben distribuir primero 50 % de las muestras, seguidos los controles y después continuar con el resto de las muestras diluidas.

Colocar la tira de pocillos en la gradilla, correctamente rotulada

Pasos de la prueba

Paso 1

- ⊕ Dejar el pozo A1 para sustrato blanco. Pipetear los controles y las muestras como sigue:
 - 100 µL de control negativo (tapa verde) en los pozos B1/C1
 - 100 µL de control positivo (tapa roja) en los pozos D1/E1
 - 100 µL de muestras diluidas en el resto de los pozos
- ⊕ Cubrir las tiras con sellador

- ⊕ Incubar 30 min. a temperatura ambiente (17....25°C)
- ⊕ Aspirar el contenido de los pozos y descartar en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % y añadir a cada pozo 400 uL de solución de lavado, incubar de 15 a 30 segundos y aspirar de nuevo. Hacer 4 ciclos de lavado y entre vaciado y llenado golpear las tiras contra papel de filtro, para eliminar el líquido que quede.

Paso 2

- ⊕ Distribuir 100 µL de conjugado anti-IgG en todos los pozos, excepto en el sustrato blanco (A1)
- ⊕ Cubrir con sellador
- ⊕ Incubar 30 minutos temperatura ambiente (17º.... 25º C).
- ⊕ Lavar las tiras 5 veces tal y como se describe en el paso 1 No 4

Paso 3

- ⊕ Distribuir 100 µL de solución de trabajo TMB en todos los pozos.
- ⊕ Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
- ⊕ Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de solución de detención de la reacción a todos los pozos.
- ⊕ Calibrar a cero el equipo de Elisa con el sustrato blanco en el pozo A1.
- ⊕ Medir la absorbancia a 450 nm (A 450)

Las tiras deben ser leídas dentro de los siguientes 30 minutos.

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte:

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte

Media de los controles negativos:

$$MNC = \frac{B1 + C1}{2}$$

Media de los controles positivos:

$$MCP = \frac{D1 + E1}{2}$$

El valor de corte se calcula según la siguiente fórmula:

$$COV = MCN + 0.1 \times MCP$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

- ⊕ El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150
- ⊕ MCN ≤ 0.250

$$\oplus \text{ MCP} \geq 0.750$$

$$\oplus \text{ MCP : MCN} \geq 5$$

Interpretación de los resultados

$$\oplus \text{ A 450 (pcte)} \geq \text{COV} + 15 \% : \text{Positivo}$$

$$\oplus \text{ A 450 (pcte)} < \text{COV} - 15 \% : \text{Negativo.}$$

Si no se cuenta con un lector de Elisa es posible realizar una interpretación visual de los resultados:

\oplus El sustrato blanco en el pozo A1 debe ser incoloro.

\oplus Una muestra se considera **positiva** si el color del pozo de la misma es definitivamente mas fuerte que el color en los pozos de los controles negativos B1/C1.

Los resultados positivos se expresan en HU/mL según la fórmula:

$$\text{HU/mL} = \frac{\text{A 450 (pcte)} \times 100}{\text{MCP}}$$

TÉCNICA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPO IgM CONTRA EL VIRUS EPSTEIN BARR (IgM EBV)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgM contra el virus Epstein Barr

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infecciones por herpes virus y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de estas infecciones que sean solicitadas por el médico de asistencia.

Definiciones

- El EBV pertenece a la familia Herpes viridae, el virus generalmente se adquiere en la infancia, los pacientes inmunocompetentes son capaces de controlar la infección, mientras que en pacientes inmunodeprimidos existe mayor persistencia viral y aparecen formas clínicas graves de mononucleosis infecciosa así como trastornos linfoproliferativos como linfomas. Establece infecciones latentes en tejido linfoide.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Señalados anteriormente.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2...8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- ⊕ Las tiras plásticas que actúan como fase sólida están cubiertas con antígenos de la *capside* derivados de cultivos celulares del virus, mediante anticuerpos (Ac) específicos monoclonales. Los antígenos de la *capside* son los mayores inmunógenos que siguen a la infección primaria por EBV. La unión por la técnica de anticuerpos monoclonales asegura una alta concentración de este inmunógeno mayor a la fase sólida y no interfiere con los antígenos de las células huésped.
- ⊕ Si la muestra del paciente contiene anticuerpos específicos, estos se unen a los antígenos que cubren la fase sólida. El *buffer* de dilución de la muestra contiene IgG antihumana, **para prevenir la interferencia del factor reumatoideo y la competencia con los IgG específicas presentes en la muestra.** Después de un paso de lavado en que se elimina el material que no se ha unido, se añade conjugado anti IgM (anticuerpos anti-IgM- humana, marcados con peroxidasa) la cual se une a los anticuerpos IgM, lo que resulta en la formación de un complejo.

EBV Ag + anti EBV IgM + anti IgM Ac humanos

- ⊕ Después de un segundo paso de lavado, donde se remueve todo el conjugado que no se ha unido, el complejo enzimático se detecta por incubación con sustrato TMB y por el desarrollo de color azul, que cambia a amarillo cuando se detiene la reacción al añadir ácido sulfúrico. Posteriormente se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM en el espécimen.

Los resultados de las muestras de pacientes se obtienen por comparación con un valor de corte.

Procedimiento

- ⊕ Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- ⊞ Se diluye el suero del paciente 1+100 con buffer de dilución (1)
- ⊞ Por ejemplo: 10 uL de suero + 1 mL de buffer de dilución (1). Mezclar
- ⊞ vigorosamente y esperar 5 min. antes de comenzar la prueba.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado de trabajo (3 a)

- Diluir la solución de trabajo (3) 1 + 20 con agua estéril
- Por ejemplo: 50 mL (3) + 1000 mL (agua)= 1 050 mL

Controles

- ⊞ Los controles suministrados en el Kit están listos para usar y no requieren dilución.
- ⊞ La distribución de las muestras y los controles se debe realizar lo más rápido posible, y en el caso en que este paso exceda los 5 min. se deben distribuir primero el 50 % de las muestras, seguido los controles y después continuar con el resto de las muestras diluidas.
- ⊞ Colocar la tira de pocillos en la gradilla, correctamente rotulada

Pasos de la prueba:

Paso 1

- ⊞ Dejar el pozo A1 para sustrato blanco. Pipetear los controles y las muestras como sigue:
 - 100 µL de control negativo (tapa verde) en los pozos B1/C1
 - 100 µL de control positivo (tapa roja) en los pozos D1/E1
 - 100 µL de muestras diluidas en el resto de los pozos
- ⊞ Cubrir las tiras con sellador
- ⊞ Incubar 30 min. a temperatura ambiente (17....25°C)
- ⊞ Aspirar el contenido de los pozos y descartar en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % y añadir a cada pozo 400 µL de solución de lavado, incubar de 15 a 30 segundos y aspirar de nuevo. Hacer 4 ciclos de lavado y entre vaciado y llenado golpear las tiras contra papel de filtro, para eliminar el líquido que quede.

Paso 2

- ⊞ Distribuir 100 µL de conjugado anti-IgM en todos los pozos, excepto en el sustrato blanco (A1)
- ⊞ Cubrir con sellador
- ⊞ Incubar 30 minutos temperatura ambiente (17.... 25° C)
- ⊞ Lavar las tiras 5 veces tal y como se describe en el paso 1 No 4

Paso 3

- ⊕ Distribuir 100μ de solución de trabajo TMB en todos los pozos.
- ⊕ Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.
- ⊕ Detener la reacción enzimática añadiendo 100 μL de solución de detención de la reacción (5) a todos los pozos.
- ⊕ Calibrar a cero el equipo de Elisa con el sustrato blanco en el pozo A1.
- ⊕ Medir la absorbancia a 450 nm (A 450)

Las tiras deben ser leídas dentro de los siguientes 30 minutos.

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte

Media de los controles negativos:

$$\text{MNC} = \frac{\text{B1} + \text{C1}}{2}$$

Media de los controles positivos:

$$\text{MCP} = \frac{\text{D1} + \text{E1}}{2}$$

El valor de corte se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{COV} = \text{MCN} + 0.2 \times \text{MCP}$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150

MCN ≤ 0.250

MCP ≥ 0.400

MCP: MCN ≥ 3

Interpretación de los resultados

- ⊕ A 450 (pcte) ≥ COV + 15 % : Positivo
- ⊕ A 450 (pcte) < COV – 15 %: Negativo.

Se pueden presentar resultados positivos de IgM contra EBV en pacientes con infección por CMV, esto puede deberse a una reactivación de una infección latente por EBV. Por tanto la posibilidad de infección por CMV se debe excluir a la hora de interpretar los resultados

Si no se cuenta con un lector de Elisa es posible realizar una interpretación visual de los resultados:

- ⊕ El sustrato blanco en el pozo A1 debe ser incoloro.

- ⊞ Una muestra se considera **positiva** si el color del pozo de la misma es definitivamente mas fuerte que el color en los pozos de los controles negativos B1/C1.

TÉCNICA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS IgG CONTRA EL VIRUS EPSTEIN BARR (IgG EBV)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgG contra el virus Epstein-Barr

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infecciones por herpes virus y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de estas infecciones que sean solicitadas por el médico de asistencia.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Señalados anteriormente.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2....8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- ⊞ La prueba se basa en un ELISA para la detección de anticuerpos de tipo IgG específicos para el virus de Epstein Barr (EBV) en suero. Los pozos en las microtiras están cubiertos con antígenos de EBV. Si en la muestra del paciente hay presencia de anticuerpos específicos, estos se unen a los antígenos que cubren la fase sólida. El buffer de dilución de la muestra contiene IgG antihumana, para prevenir la interferencia del factor reumatoideo y la competencia con los IgG específicas presentes

en la muestra. Después de los pasos de lavado en que se elimina el material que no se ha unido, se añade un conjugado anti IgG (anticuerpos anti-IgG humana, marcados con peroxidasa) la cual se une a los anticuerpos IgG, lo que resulta en la formación de un complejo.

EBV Ag + anti EBV IgG + anti IgG Ac humanos

- ⊕ Después de un segundo paso de lavado, donde se remueve todo el conjugado que no se ha unido, el complejo enzimático se detecta por incubación con sustrato TMB y por el desarrollo de color azul, que cambia a amarillo cuando se detiene la reacción al añadir ácido sulfúrico. Posteriormente se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgG en el espécimen.
- ⊕ Los resultados de las muestras de pacientes se obtienen por comparación con un valor de corte, o por expresión en Human Units, basados en el control positivo.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- Se diluye el suero del paciente 1+20 con buffer de dilución (1)
- Por ejemplo: 10 µL de suero + 200 µL de buffer de dilución (1)

Se debe mezclar vigorosamente y esperar 5 min. antes de comenzar la prueba.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado de trabajo (3 a)

Diluir la solución de trabajo (3) 1 + 20 con agua estéril

Por ejemplo: 50 mL (3) + 1 000 mL (agua)= 1 050 mL

Controles

- ⊕ Los controles suministrados en el Kit están listos para usar y no requieren dilución.
- ⊕ La distribución de las muestras y los controles se debe realizar lo más rápido posible, y en el caso en que este paso exceda los 5 minutos, se deben distribuir primero el 50 % de las muestras; seguido los controles y después continuar con el resto de las muestras diluidas.

Colocar la tira de pocillos en la gradilla, correctamente rotulada

Pasos de la prueba

Paso 1

Dejar el pozo A1 para sustrato blanco. Pipetear los controles y las muestras como sigue:

- 100 uL de control negativo (tapa verde) en los pozos B1/C1
- 100 uL de control positivo (tapa roja) en los pozos D1/E1
- 100 uL de muestras diluidas en el resto de los pozos
- ⊞ Cubrir las tiras con sellador
- ⊞ Incubar 60 min. a temperatura ambiente (17....25°C)
- ⊞ Aspirar el contenido de los pozos y descartar en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % y añadir a cada pozo 400 uL de solución de lavado, incubar de 15 a 30 segundos y aspirar de nuevo. Hacer 4 ciclos de lavado y entre vaciado y llenado golpear las tiras contra papel de filtro, para eliminar el líquido que quede.

Paso 2

- ⊞ Distribuir 100 uL de conjugado anti-IgG en todos los pozos, excepto en el sustrato blanco (A1)
- ⊞ Cubrir con sellador
- ⊞ Incubar 30 minutos temperatura ambiente (17.... 25° C).
- ⊞ Lavar las tiras 5 veces tal y como se describe en el paso 1 No 4

Paso 3

- ⊞ Distribuir 100 µL de solución de trabajo TMB (4 a) en todos los pozos.
- ⊞ Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
- ⊞ Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de solución de detención de la reacción (5) a todos los pozos.
- ⊞ Calibrar a cero el equipo de Elisa con el sustrato blanco en el pozo A1.
- ⊞ Medir la absorbancia a 450 nm (A 450)

Las tiras deben ser leídas dentro de los siguientes 30 minutos.

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte

Media de los controles negativos:

$$MNC = \frac{B1 + C1}{2}$$

Media de los controles positivos:

$$MCP = \frac{D1 + E1}{2}$$

El valor de corte se calcula según la siguiente fórmula:

$$COV = MCN + 0.1 \times MCP$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150

MCN \leq 0.250

MCP \geq 0.750

MCP: MCN \geq 5

Interpretación de los resultados

- Las muestras con valores de absorbancia iguales o mayores que el valor de corte se consideran positivas para anticuerpos contra EBV y por el contrario, las muestras con valores menores se consideran negativas.

⊕ A 450 (pcte) \geq COV + 15 % : Positivo

⊕ A 450 (pcte) < COV – 15 %: Negativo.

- Si no se cuenta con un lector de Elisa es posible realizar una interpretación visual de los resultados:

El sustrato blanco en el pozo A1 debe ser incoloro.

- Una muestra se considera **positiva** si el color del pozo de la misma es definitivamente mas fuerte que el color en los pozos de los controles negativos B1/C1.
- La significación clínica de cambios a niveles de IgG específicas para EBV, se deben interpretar con cuidado. Debido a la reactivación de infecciones latentes de otros virus relacionados con la familia herpes viridae pueden presentarse resultados positivos en sueros de pacientes con estas infecciones. La posibilidad de infecciones por otros miembros de la familia herpes viridae, se debe investigar antes de la interpretación de los resultados.

Los resultados positivos se expresan en HU/mL, según la fórmula:

$$HU/mL = \frac{A\ 450\ (pcte) \times 100}{MCP}$$

TÉCNICA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS IgM CONTRA EL VIRUS HERPES SIMPLE (IgM HSV)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgM contra el virus herpes simple

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infecciones por herpes virus y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de estas infecciones que sean solicitadas por el médico de asistencia.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Señalados anteriormente.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de cristal 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2....8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- Se trata de un ELISA para la determinación de anticuerpos del tipo IgM contra el virus de herpes simple. Las tiras plásticas que actúan como fase sólida están cubiertas con antígeno del virus Herpes simple. Si en la muestra del paciente hay presencia de anticuerpos específicos, estos se unen a los antígenos que cubren la fase sólida. El buffer de dilución de la muestra contiene IgG antihumana, para **prevenir la interferencia del factor reumatoideo y la competencia con los IgG específicas presentes en la muestra.** Después de los pasos de lavado en que se elimina el material que no se ha unido, se añade un conjugado anti IgM humana, la cual se une a los anticuerpos IgM unidos, formándose el complejo:

HSV Ag + anti HSV IgM + anti IgM Ac humanos

- Después de un segundo paso de lavado, donde se remueve todo el conjugado que no se ha unido, el complejo enzimático se detecta por incubación con sustrato TMB y por el desarrollo de color azul, que cambia a amarillo cuando se detiene la reacción al añadir ácido sulfúrico. Posteriormente se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM en el espécimen.

- Los resultados de las muestras de pacientes se obtienen por comparación con un valor de corte.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- Se diluye el suero del paciente 1+100 con buffer de dilución (1)
- Por ejemplo: 10 uL de suero + 1 mL de buffer de dilución (1). Mezclar vigorosamente y esperar 5 minutos antes de comenzar la prueba.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado de trabajo (3 a)

- Diluir la solución de trabajo (3) 1 + 20 con agua estéril
Por ejemplo: 50 mL (3) + 1 000 mL (agua)= 1 050 mL

Controles

- ⊕ Los controles suministrados en el Kit están listos para usar y no requieren dilución. La distribución de las muestras y los controles se debe realizar lo mas rápido posible, y en el caso en que este paso exceda los 5 minutos, se deben distribuir primero el 50 % de las muestras, seguidos los controles y después continuar con el resto de las muestras diluidas.

Colocar la tira de pocillos en la gradilla, correctamente rotulada

Pasos de la prueba

Paso 1

Dejar el pozo A1 para sustrato blanco. Pipetear los controles y las muestras como sigue:

- 100 µL de control negativo (tapa verde) en los pozos B1/C1
- 100 µL de control positivo (tapa roja) en los pozos D1/E1
- 100 µL de muestras diluidas en el resto de los pozos
- ⊕ Cubrir las tiras con sellador
- ⊕ Incubar 60 min. a temperatura ambiente (17....25°C)
- ⊕ Aspirar el contenido de los pozos y descartar en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % y añadir a cada pozo 400 uL de solución de lavado, incubar de 15 a 30 segundos y aspirar de nuevo. Hacer 4 ciclos de lavado y entre vaciado y llenado golpear las tiras contra papel de filtro, para eliminar el líquido que quede.

Paso 2

- ⊕ Distribuir 100 µL de conjugado anti-IgM en todos los pozos, excepto en el sustrato blanco (A1)
- ⊕ Cubrir con sellador
- ⊕ Incubar 30 minutos temperatura ambiente (17.... 25° C).
- ⊕ Lavar las tiras 5 veces tal y como se describe en el paso 1 No 4

Paso 3

- ⊕ Distribuir 100 µL de solución de trabajo TMB en todos los pozos.
- ⊕ Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
- ⊕ Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de solución de detención de la reacción (5) a todos los pozos.
- ⊕ Calibrar a cero el equipo de Elisa con el sustrato blanco en el pozo A1.
- ⊕ Medir la absorbancia a 450 nm (A 450)

Las tiras deben ser leídas dentro de los siguientes 30 minutos.

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte

Media de los controles negativos:

$$\text{MNC} = \frac{B1 + C1}{2}$$

Media de los controles positivos:

$$\text{MCP} = \frac{D1 + E1}{2}$$

El valor de corte se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{COV} = \text{MCN} + 0.2 \times \text{MCP}$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150

MCN ≤ 0.250

MCP ≥ 0.400

MCP: MCN ≥ 3

Interpretación de los resultados

- Las muestras con valores de absorbancia iguales o mayores que el valor de corte se consideran positivas para anticuerpos contra EBV y por el contrario, las muestras con valores menores se consideran negativas.
- ⊕ A 450 (pcte) ≥ COV + 15 % : Positivo

⊕ A 450 (pcte) < COV – 15 %: Negativo.

- Si no se cuenta con un lector de Elisa es posible realizar una interpretación visual de los resultados:

El sustrato blanco en el pozo A1 debe ser incoloro.

- Una muestra se considera **positiva** si el color del pozo de la misma es definitivamente mas fuerte que el color en los pozos de los controles negativos B1/C1.

TÉCNICA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS IgM CONTRA EL PARÁSITO TOXOPLASMA GONDII (IgM TOXO)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgM contra el parásito Toxoplasma gondii

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infección por toxoplasma y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de esta infección que sea solicitada por el médico de asistencia.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Señalados anteriormente.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de cristal 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará almacenará hasta por 7 días de 2....8 °C o por más largo tiempo a –20 °C. **Congelar solamente una vez.**
- Esta prueba es un análisis inmunoenzimático, para la detección de anticuerpos del tipo IgM para Toxoplasma gondii en suero.
- **Definiciones:** el Toxoplasma infecta a toda clase de mamífero y aves. Es el parásito intracelular mas ampliamente distribuido. Los seres humanos se

infectan a través de la contaminación con heces fecales, carne mal cocinada o por inoculación directa a través de transfusiones o transmisión congénita.

- Las mujeres embarazadas que adquieren la infección durante el primer trimestre tienen 25 % de riesgo de transmisión fetal que resulta en abortos espontáneos, enfermedad aparente o enfermedad severa. Sesenta y cinco por ciento de los niños nacidos de madres infectadas durante el tercer trimestre tienen infección subclínica, desarrollando finalmente el 85 % coriorretinitis o secuelas neurológicas.

Fundamento

- Se trata de un ELISA tipo *sándwich* para la determinación de anticuerpos del tipo IgM contra el parásito *Toxoplasma gondii*. Las tiras con micropozos actúan como fase sólida, cubiertas con antígenos de membrana purificados de *Toxoplasma gondii*. Si en la muestra del paciente hay presencia de anticuerpos específicos, estos se unen a los antígenos que cubren la fase sólida. El buffer de dilución de la muestra contiene IgG antihumana, para **prevenir la interferencia del factor reumatoideo y la competencia con los IgG específicas presentes en la muestra**. Después de los pasos de lavado en que se elimina el material que no se ha unido, se añade un conjugado anti IgM (anticuerpos anti-IgM-humana, marcados con peroxidasa) la cual se une a los anticuerpos IgM, formándose el complejo:

Toxo Ag + anti Toxo IgM + anti IgM Ac humanos

- Después de un segundo paso de lavado, donde se remueve todo el conjugado que no se ha unido, el complejo enzimático se detecta por incubación con sustrato TMB y por el desarrollo de color azul, que cambia a amarillo cuando se detiene la reacción al añadir ácido sulfúrico. Posteriormente se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM en el espécimen.
- Los resultados de las muestras de pacientes se obtienen por comparación con un valor de corte.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- ⊕ Se diluye el suero del paciente 1+100 con buffer de dilución (1)
- ⊕ Por ejemplo: 10 uL de suero + 1 mL de buffer de dilución (1)

Se debe mezclar vigorosamente y esperar 5 min. antes de comenzar la prueba.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado de trabajo (3 a)

⊞ Diluir la solución de trabajo (3) 1 + 20 con agua estéril

Por ejemplo: 50 mL (3) + 1000 mL (agua)= 1050 mL

Controles

- Los controles suministrados en el Kit están listos para usar y no requieren dilución.
- La distribución de las muestras y los controles se debe realizar lo mas rápido posible, y en el caso en que este paso exceda los 5 minutos, se deben distribuir primero el 50 % de las muestras, seguidos los controles y después continuar con el resto de las muestras diluidas.
- Colocar la tira de pocillos en la gradilla, correctamente rotulada

Pasos de la prueba

Paso 1

- ⊞ Dejar el pozo A1 para sustrato blanco (4 a). Pipetear los controles y las muestras como sigue:
 - 100 µL de control negativo (tapa verde) en los pozos B1/C1
 - 100 µL de control positivo (tapa roja) en los pozos D1/E1
 - 100 µL de muestras diluidas en el resto de los pozos
- ⊞ Cubrir las tiras con sellador
- ⊞ Incubar 60 min. a temperatura ambiente (17....25°C)
- ⊞ Aspirar el contenido de los pozos y descartar en una solución de hipoclorito de sodio 0.5 % y añadir a cada pozo 400 uL de solución de lavado, incubar de 15 a 30 segundos y aspirar de nuevo. Hacer 4 ciclos de lavado y entre vaciado y llenado golpear las tiras contra papel de filtro, para eliminar el líquido que quede.

Paso 2

- ⊞ Distribuir 100 µL de conjugado anti-IgM en todos los pozos, excepto en el sustrato blanco (A1)
- ⊞ Cubrir con sellador
- ⊞ Incubar 30 minutos temperatura ambiente (17.... 25° C).
- ⊞ Lavar las tiras 5 veces tal y como se describe en el paso 1 No 4

Paso 3

- ⊞ Distribuir 100 µL de solución de trabajo TMB en todos los pozos.
- ⊞ Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
- ⊞ Detener la reacción enzimática añadiendo 100 µL de solución de detención de la reacción (5) a todos los pozos.

- ⊕ Calibrar a cero el equipo de Elisa con el sustrato blanco en el pozo A1.
- ⊕ Medir la absorbancia a 450 nm (A 450)

Las tiras deben ser leídas dentro de los siguientes 30 minutos.

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte

Media de los controles negativos:

$$MNC = \frac{B1 + C1}{2}$$

Media de los controles positivos:

$$MCP = \frac{D1 + E1}{2}$$

El valor de corte se calcula según la siguiente fórmula:

$$COV = MCN + 0.2 \times MCP$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

- ⊕ El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150
- ⊕ MCN ≤ 0.250
- ⊕ MCP ≥ 0.400
- ⊕ MCP : MCN ≥ 3

Interpretación de los resultados

- ⊕ A 450 (pcte) ≥ COV + 15 % : Positivo
- ⊕ A 450 (pcte) < COV – 15 %: Negativo.
- Debido a variaciones fisiológicas y analíticas los resultados de los pacientes que caigan por encima o por debajo del 15 % del valor de corte son equivocas y por tanto se recomienda medir estas muestras en paralelo con una muestra fresca tomada de 7 a 14 días después.
- Las muestras de pacientes con mononucleosis infecciosa pueden dar valores equívocos o resultados débiles reactivos. Esto puede ser debido a la reactivación en la producción de anticuerpos IgM contra toxoplasma. La posibilidad de una infección con mononucleosis se debe investigar antes de la interpretación de los resultados.
- Si no se cuenta con un lector de Elisa es posible realizar una interpretación visual de los resultados:
 - ⊕ El sustrato blanco en el pozo A1 debe ser incoloro.

- ⊞ Una muestra se considera **positiva** si el color del pozo de la misma es definitivamente mas fuerte que el color en los pozos de los controles negativos B1/C1.

Nota: Turbidez en el buffer de dilución IgM (1) después de añadir la muestra no interfiere en los resultados.

TÉCNICA DE ELISA PARA EL DIAGNÓSTICO DE ANTICUERPOS IgG CONTRA EL PARÁSITO TOXOPLASMA GONDII (IgG TOXO)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgG contra el parásito Toxoplasma gondii

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infección por toxoplasma y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de esta infección que sea solicitada por el médico de asistencia.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Señalados anteriormente.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de cristal 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2....8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**
- Esta prueba es un análisis inmunoenzimático, para la detección de anticuerpos del tipo IgG para Toxoplasma gondii en suero.

Fundamento

- Se trata de un ELISA para la determinación de anticuerpos del tipo IgG contra el parásito Toxoplasma gondii. Las tiras con micropozos actúan como fase sólida, cubiertas con antígenos de membrana purificados de Toxoplasma gondii. Si en la muestra del paciente hay presencia de

anticuerpos específicos, estos se unen a los antígenos que cubren la fase sólida. El buffer de dilución de la muestra contiene IgG antihumana, para prevenir la interferencia del factor reumatoideo y la competencia con los IgG específicas presentes en la muestra. Después de los pasos de lavado en que se elimina el material que no se ha unido, se añade conjugado anti IgG (anticuerpo anti-IgG- humana) la cual se une a los anticuerpos IgG, formándose el complejo:

Toxo Ag + anti Toxo IgG + anti IgG Ac humanos

- Después de un segundo paso de lavado, donde se remueve todo el conjugado que no se ha unido, el complejo enzimático se detecta por incubación con sustrato TMB y por el desarrollo de color azul, que cambia a amarillo cuando se detiene la reacción al añadir ácido sulfúrico. Posteriormente se lee la absorbancia a 450 nm utilizando un lector de ELISA. La intensidad del color es directamente proporcional a la cantidad de anticuerpos IgM en el espécimen.
- Los resultados de las muestras de pacientes se obtienen por comparación con un valor de corte.

Procedimiento

Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- Se diluye el suero del paciente 1+100 con buffer de dilución (1)

Por ejemplo: 10 µL de suero + 1 mL de buffer de dilución (1)

Se debe mezclar vigorosamente y esperar 5 minutos antes de comenzar la prueba.

Preparación de los reactivos

Solución de lavado de trabajo (3 a)

- Diluir la solución de trabajo (3) 1 + 20 con agua estéril
- Por ejemplo: 50 mL (3) + 1 000 mL (agua)= 1 050 mL

Controles

- Los controles suministrados en el Kit están listos para usar y no requieren dilución.
- La distribución de las muestras y los controles se debe realizar lo mas rápido posible, y en el caso en que este paso exceda los 5 minutos, se deben distribuir primero el 50 % de las muestras, seguidos los controles y después continuar con el resto de las muestras diluidas.
- Colocar la tira de pocillos en la gradilla, correctamente rotulada

Pasos de la prueba

Paso 1

- ⊕ Dejar el pozo A1 para sustrato blanco (4 a). Pipetear los controles y las muestras como sigue:
 - 100 µL de control negativo (8) en los pozos B1/C1
 - 100 µL de control del valor de corte (9) en los pozos D1/E1
 - 100 µL de control positivo bajo (10) en los pozos F1/G1
 - 100 µL de control positivo medio (11) en los pozos H1/A2
 - 100 µL de control positivo alto (12) en los pozos B2/D2
 - 100 µL de muestras diluidas en el resto de los pozos
- ⊕ Cubrir las tiras con sellador
- ⊕ Incubar 60 min. a temperatura ambiente (17....25°C)
- ⊕ Aspirar el contenido de los pozos y descartar en una solución de hipoclorito de sodio 5 % y añadir a cada pozo 400 uL de solución de lavado, incubar de 15 a 30 segundos y aspirar de nuevo. Hacer 4 ciclos de lavado y entre vaciado y llenado golpear las tiras contra papel de filtro, para eliminar el líquido que quede.

Paso 2

- ⊕ Distribuir 100 uL de conjugado anti-IgM (6) en todos los pozos, excepto en el sustrato blanco (A1)
- ⊕ Cubrir con sellador
- ⊕ Incubar 30 minutos temperatura ambiente (17.... 25° C). Durante la incubación preparar la solución de trabajo TMB (4a), suficiente para el número de pozos empleados.

Lavar las tiras 5 veces tal y como se describe en el paso 1 No 4

Paso 3

- ⊕ Distribuir 100 uL de solución de trabajo TMB (4 a) en todos los pozos.
- ⊕ Incubar 15 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad
- ⊕ Detener la reacción enzimática añadiendo 100 uL de solución de detención de la reacción (5) a todos los pozos.
- ⊕ Calibrar a cero el equipo de Elisa con el sustrato blanco en el pozo A1.
- ⊕ Medir la absorbancia a 450 nm (A 450)

Las tiras deben ser leídas dentro de los siguientes 30 minutos.

Cálculo de los valores de los controles y del valor de corte

Calcular el valor medio de absorbancia del control negativo (MCN), control del valor de corte (MCC) y controles positivos (MCP bajo, medio y alto)

$$\text{Ej. MCP medio} = \frac{A_{450} (H1) + A_{450} (A2)}{2}$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

- El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150
- MCN < MCC
- MCP medio ≥ 0.700
- MCPmedio: MCN ≥ 5

Media de los controles negativos:

$$\text{MNC} = \frac{B1 + C1}{2}$$

Media de los controles positivos:

$$\text{MCP} = \frac{D1 + E1}{2}$$

El valor de corte se calcula según la siguiente fórmula:

$$\text{COV} = \text{MCN} + 0.2 \times \text{MCP}$$

La prueba se considera valida si se cumple lo siguiente:

- ⊕ El sustrato blanco en el pozo A1 < 0.150
- ⊕ MCN ≤ 0.250
- ⊕ MCP ≥ 0.400
- ⊕ MCP : MCN ≥ 3

Interpretación de los resultados

- A 450 (pcte) $\geq \text{COV} + 15 \%$: Positivo
- A 450 (pcte) < COV – 15 %: Negativo.
- Debido a variaciones fisiológicas y analíticas los resultados de los pacientes que caigan por encima o por debajo del 15 % del valor de corte son equivocas y por tanto se recomienda medir estas muestras en paralelo con una muestra fresca tomada de 7 a 14 días después.
- Las muestras de pacientes con mononucleosis infecciosa pueden dar valores equívocos o resultados débiles reactivos. Esto puede ser debido a la reactivación en la producción de anticuerpos IgM contra toxoplasma. La

posibilidad de una infección con mononucleosis se debe investigar antes de la interpretación de los resultados.

- Si no se cuenta con un lector de Elisa es posible realizar una interpretación visual de los resultados:
 - ⊕ El sustrato blanco en el pozo A1 debe ser incoloro.
 - ⊕ Una muestra se considera **positiva** si el color del pozo de la misma es definitivamente mas fuerte que el color en los pozos de los controles negativos B1/C1.

MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DETECCIÓN DEL ANTÍGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS HEPATITIS B (HbsAG)

Objetivo

- Determinar de forma rápida la presencia en suero o plasma del HbsAg

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes posibles donantes de órganos, que sea solicitada por el médico coordinador del trasplante.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

Equipos

- Centrífuga

Materiales

- Pipeta Pasteur de 500 µL
- Tubos de 13 x 100
- Viales plásticos.
- Cronómetro
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (0.5 %) u otro desinfectante aceptable.
- Contenedores de desechos biológicamente peligrosos para materiales potencialmente contaminados

Reactivos

- Tira del test

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2.8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez**

Fundamento

- El HEXAGON HbsAg es una prueba de un solo paso para la detección cualitativa del antígeno de superficie del virus de la hepatitis B (HbsAg) en suero o plasma humano. La prueba está basada en un método inmunocromatográfico.
- El HbsAg presente en el suero o plasma reacciona con las partículas de oro coloidal las cuales han sido cubiertas con anticuerpo monoclonal de ratón contra el HbsAg. Los inmunocomplejos migran a través de la membrana y se unen en la zona de prueba con un segundo anticuerpo monoclonal anti HbsAg (de ratón), los cuales son fijados y forman una línea horizontal (línea de prueba).
- El exceso de inmunocomplejos y/o las partículas de oro coloidal que no reaccionaron migran mas allá para formar una segunda línea al reaccionar con anticuerpos IgG anti ratón (conejo) formando la línea de control 2. Dos líneas visibles aparecerán con la presencia de HbsAg en la muestra.
- Si en la muestra no hay HbsAg o la concentración de este es menor de 1 ng/mL, solo aparecerá la línea de control. La segunda línea sirve como control del adecuado manejo y condición intacta de los reactivos. Si no hay líneas visibles en la zona de reacción indica una inadecuada ejecución o deterioro de los reactivos.

Procedimiento

- La muestra y la tira de prueba deben estar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- Se puede utilizar suero o plasma. Solo muestras frescas deben ser utilizadas para la prueba. Muestras turbias o hemolíticas deben de evitarse

Pasos de la prueba

- Sacar del tubo de aluminio las tira de pruebas que van a ser utilizadas. Tener cuidado de tocar las tiras solamente por la parte superior con las flechas apuntando hacia abajo. Cerrar el tubo inmediatamente luego de remover las tiras a usar.

- Introducir la tira con la flecha apuntando hacia abajo en un tubo con 0.25 a 0.5 mL de la muestra, la muestra no debe tocar la línea de color azul de la tira. No mover la tira mientras que el proceso inmunocromatográfico esté incompleto.

Leer el resultado a los 20 minutos de haber introducido la tira en la muestra.

Nota: El resultado positivo (2 líneas) generalmente aparece en 5 minutos, el resultado negativo puede ser confirmado solo después de 20 minutos.

Las muestras borderline (1-2 ng/mL) pueden mostrar signos positivos solo después de un periodo de incubación de 30 minutos.

Interpretación de los resultados

- **Negativo:** sólo una línea de control rojo-violeta en la línea de control (C) aparecerá en la parte superior de la ventana rectangular de resultados mostrando que la prueba ha sido llevada a cabo correctamente
- **Positivo:** una segunda línea rojo-violeta en la línea de muestra (T) aparece en la parte baja de la ventana rectangular de resultados, indicando que el resultado es positivo.

Aún una línea débil indica un resultado positivo.

Si no aparece la línea de control, debe repetirse la prueba con muestra fresca

MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO PARA DETECCIÓN DE ANTI CUERPOS CONTRA VIRUS DE HEPATITIS C HUMANO (VHC)

Objetivo

- Determinar de forma rápida y cualitativa la presencia de anticuerpos IgG contra el virus de la hepatitis C en sangre total, suero o plasma humanos.

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes posibles donantes de órganos, que sea solicitada por el médico coordinador del trasplante.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos

- Centrífuga

Materiales

- Pipetas desechables aprox. 10 µL
- Tubos de 13 x 100
- Viales plásticos.

- Cronómetro
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (0.5 %) u otro desinfectante aceptable.
- Contenedores de desechos biológicamente peligrosos para materiales potencialmente contaminados

Reactivos

- Placas envasadas en un sobre sellado.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2.8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- Si la muestra contiene anticuerpos anti-HVC, éstos reaccionarán con las partículas coloidales rojas que están conjugadas con anticuerpos monoclonales anti-Ig humanas. Los complejos partículas coloidales/anticuerpos monoclonales/anti-HVC humano migrarán por cromatografía hacia la zona de reacción donde, en una primera línea, está depositado el antígeno representativo del HVC que capturará los complejos de partículas coloidales/anticuerpos monoclonales/anti-HVC humano produciéndose una banda transversal ROJA.

Procedimiento

- La muestra y los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.


Preparación de la muestra

- Se puede utilizar suero o plasma. Solo muestras frescas deben ser utilizadas para la prueba. Muestras turbias o hemolíticas deben de evitarse.

Preparación del reactivo

- No lleva preparación

Pasos de la prueba

- Extraer la placa del sobre y colocarla sobre una superficie plana. Identificar cada placa con los datos de la muestra.
- Manteniendo el gotero en posición vertical, dispensar 4 gotas o 125 uL del espécimen en la ventana circular de la placa ()

Utilizar una pipeta desechable para cada transferencia, a fin de evitar contaminaciones cruzadas.

- Leer el resultado a los 10 minutos. Dependiendo de la concentración de anticuerpo se podrán observar resultados positivos en menos de 10 minutos.

Interpretación de los resultados

- **Negativo:** Sólo aparece una banda coloreada azul en la zona control(C).
- **Positivo:** Además de la banda azul en la zona control (C) también aparece otra roja en la zona test (T)

Inválido

Si no aparece ninguna línea de control, aún si aparece una línea de *test*, el *test* debe repetirse con uno nuevo.

MÉTODO INMUNOCROMATOGRÁFICO DE 3RA GENERACIÓN PARA LA DETECCIÓN DE ANTICUERPOS CONTRA EL VIRUS 1 Y 2 DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA (HIV)

Objetivo

- Determinar de forma rápida y cualitativa la presencia de anticuerpos IgG, IgA e IgM contra los virus de la inmunodeficiencia humana HIV 1 y HIV 2 en sangre total, suero o plasma humanos.

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes posibles donantes de órganos, que sea solicitada por el médico coordinador del trasplante.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos

- Centrífuga

Materiales

- Pipetas Pasteur 10 uL
- Tubos de 13 x 100
- Viales plásticos.
- Cronómetro
- Guantes desechables
- Solución de hipoclorito de sodio (0.5 %) u otro desinfectante aceptable.

- Contenedores de desechos biológicamente peligrosos para materiales potencialmente contaminados

Reactivos

- Dispositivos de prueba
- Diluyente.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2...8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- El ensayo HEXAGON HIV es un ensayo de 3ra generación basado en un método inmunocromatográfico.
- El ensayo emplea antígenos recombinantes representando las regiones inmunodominantes de las proteínas de la envoltura de los virus HIV 1 y HIV 2. Antígenos de captura gp41 y p24 del HIV 1 son fijados sobre la membrana en la línea de prueba 1 y el antígeno de captura gp 36 del HIV 2 es inmovilizado en la línea de prueba 2. Los mismos antígenos, marcados con un colorante, se encuentran en el vellón de conjugado del dispositivo. Una región angosta de la tira reactiva, sensibilizada con anticuerpos anti-HIV, sirve de línea de control C.
- Cuando la muestra migra a través del vellón de conjugado los anticuerpos anti-HIV 1 o anti HIV 2 específicos a los antígenos recombinantes se ligan específicamente al conjugado coloreado, formando inmunocomplejos los que son inmovilizados por los antígenos de captura recombinantes fijadas en las líneas de prueba 1 y 2, produciendo allí líneas rojas violetas. El excedente del conjugado se fija en la línea de control C que indica el funcionamiento correcto de la prueba.

Procedimiento

- La muestra y los reactivos deben estar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Preparación de la muestra

- Se puede utilizar sangre total, suero o plasma. Solo muestras frescas deben ser utilizadas para la prueba. Muestras turbias o hemolíticas deben de evitarse.

Preparación del reactivo:

- No lleva preparación.

Pasos de la prueba

- Remover el dispositivo de la bolsa.
- Rotule el dispositivo para identificar al paciente.
- Colocar 20 uL de sangre o 10 uL de suero o plasma en la zona reactiva (S) del dispositivo test. Toque el vellón con la punta de la pipeta. Las muestras deberían aplicarse con pipetas de laboratorios usuales. Pipetear la muestra en la parte superior de la ventana de muestra (S) cerca de la ventana de resultados para obtener resultados reproducibles. La muestra debe absorberse enteramente.
- Añadir 3 gotas de diluyente a la ventana de muestra.
- Lea los resultados dentro de los 5 a 20 minutos. Las muestras muy reactivas producirán una línea de prueba ya después de unos pocos minutos, mientras que las muestras de baja reactividad deberán leerse después de 20 minutos. No los interprete después de 20 minutos.

Interpretación de los resultados

- **Negativo:** solo la línea de control rojo-violeta (C) aparece en la parte superior de la ventana rectangular indicando la realización apropiada del ensayo y funcionamiento correcto de los reactivos.
- **Positivo:** una o dos líneas de prueba roja-violetas apareciendo debajo de C indican un resultado positivo para anticuerpos anti HIV 1 (línea 1) o del HIV 2 (línea 2) en la muestra. Aún una línea débil debe interpretarse como resultado reactivo. Intensidades diferentes entre la línea control y las líneas de prueba pueden ocurrir, pero estas son irrelevantes para la interpretación.
- **Inválido:** si no aparece ninguna línea de control, aún si aparece una línea de *test*, el *test* debe repetirse con uno nuevo.

PROCESAMIENTO TÉCNICO DE MUESTRAS PARA HIV, HVC, Y HBsAg POR TECNOLOGÍA SUMA

CONTENIDO

- Procesamiento técnico de muestra para HIV
- Procesamiento técnico de muestra para HVC
- Procesamiento técnico de muestra para HbsAg
- Procesamiento técnico para confirmar muestras positivas con el UMELISA HBsAg

PROCESAMIENTO TÉCNICO DE MUESTRA PARA HIV

Alcance

- Las muestras de sangre para HIV se tomarán en la consulta externa del departamento de Microbiología del policlínico, en el horario de 7.00-11.00 a.m por el técnico de la consulta, a partir de esa hora son traídas al laboratorio para su procesamiento. Las muestras a pacientes hospitalizados son tomadas por técnicos fijos que van a los pisos en el horario de 7.00-8.00 a.m y traídas por los mismos al laboratorio. Ambas muestras (consulta y sala), se registrarán en el libro de la sección con la fecha correspondiente, sala, cama ó número de consulta externa.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- No procede nada específico, las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Alcohol
- Jeringuillas
- Tubos de vidrio limpios
- Centrífuga
- Incubadora
- Aire acondicionado
- Pipetas (10 mL)
- Pipetas de precisión entre 5-1000 microlitros
- Pipeta multicanal
- Probetas graduadas entre 10- 250 mL
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio
- Papel absorbente
- Puntas amarillas y azules para pipetas de precisión
- Reloj
- Termómetro
- Cámara húmeda
- Cubeta para desechar puntas
- Palanganas para lavado de placas
- Lavador automático MW-2001

- Equipo SUMA PR-521
- Computadora con impresora

Operaciones preliminares

- El producto patológico que se utiliza en la totalidad de las pruebas es el suero que se obtiene removiendo el coágulo formado en los tubos (sin anticoagulante) y dejando reposar alrededor de 20-30 min. a temperatura ambiente; para acelerar el proceso se puede colocar el suero a 37°C por unos minutos hasta que se produzca la retracción del coágulo. Posteriormente se centrifugan los tubos durante 10 min. a 3 000 rpm. y finalmente se extrae el suero con ayuda de una pipeta.

Procedimiento

Toma de muestra

- Se realizará por punción venosa con jeringuilla y aguja estéril, previa desinfección con alcohol 70 % de la zona. Después de la centrifugación y obtención del suero, se procederá a realizar el estudio.

UMELISA HIV 1 + 2 RECOMBINANT

Reactivos

- Reactivo 1 (R1): solución tampón
- Reactivo 2 (R2): suero de carnero
- Reactivo 3 (R3): control negativo
- Reactivo 4 (R4): control positivo
- Reactivo 5 (R5): conjugado
- Reactivo 6 (R6): sustrato
- Reactivo 7 (R7): tampón sustrato

Preparación de las soluciones de trabajo

- R1: para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare solo lo necesario para el ensayo.
- R2: diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 ml (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare solo lo necesario para el ensayo.
- R3: listo para usar.
- R4: listo para usar
- R5: listo para usar (cantidad necesaria por tira: 0,2 mL)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	1	1	1	
A	B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	A
B	B	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	B
C	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	C
D	P	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	D
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	E
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	F
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89	G
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90	H

- R6: diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira 0,5 ml (0,05 mL de R6 + 0,45 ml de R7. Prepare inmediatamente antes de usar y solo lo necesario para el ensayo.

Procedimiento técnico

Preparación de las muestras y controles

- ***Incubación de las muestras y controles***

- ⊕ ***Procedimiento A:*** incubar las tiras de reacción durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.
- ⊕ ***Procedimiento B:*** incubar las tiras durante 1 h a temperatura ambiente (20-25°) en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

- ***Lavado*** (utilice un lavador de la tecnología SUMA)

- ⊕ Lave las tiras de reacción 4 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (30 µL). La solución debe permanecer

como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada la vado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.

- **Adición del conjugado**

- ⊕ Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

- **Incubación del conjugado**

- ⊕ Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37°C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

- **Lavado**

- ⊕ Lave las tiras según se describe en el acápite 4.

- **Adición del sustrato**

- ⊕ Coloque 10 microlitros de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de la tira de reacción.

- **Incubación del sustrato**

- ⊕ Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°C). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 60 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las diferencias de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

- **Lectura** (se utiliza el equipo SUMA PR-521, según su manual de trabajo)

- ⊕ La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMEHISA HIV 1+2 RECOMBINAT o pueden realizarse manualmente por el operador siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

- **Control de la calidad**

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

- ⊕ Al menos uno de los duplicados del blanco (B1 ó B2) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.
- ⊕ Al menos uno de los duplicados del control negativo (N1 ó N2) debe tener una fluorescencia que no supere en más de 10 unidades a la media del blanco.
- ⊕ Al menos uno de los duplicados de control positivo (P1 ó P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60 y 180 unidades.
- ⊕ **$(NN - BB) / (P - BB) < 0.1$**

Donde:

NN: Valor promedio del control negativo

BB: Valor promedio del blanco

P: Menor valor de fluorescencia de los duplicados del control positivo que se encuentre dentro de los límites de calidad.

- **Nivel de corte**

- ⊕ Las muestras de suero o las de sangre colectadas en papel de filtro se consideran **positivas** cuando:

- $(Fi-BB) / (P-BB) \geq 0,300$

- Fi = Fluorescencia de la muestra.

- ⊕ Las muestras se consideran en el **umbral de positividad** (BL), cuando sus resultados se encuentran en una zona comprendida entre el nivel de corte y 15 % por debajo del mismo ("zona gris").

Una muestra será "BL" cuando: $0,300 > (Fi-BB)/(PP-BB) \geq 0,255$

Para definir de una forma rápida el nivel de corte y el límite inferior de la "zona gris" cuando no se dispone de programa automático, se calcula el valor de fluorescencia correspondiente para cada caso.

$$Fnc = 0,300 (P-BB) + BB$$

$$Fbl = 0,255 (P-BB) + BB$$

Donde:

Fnc = Valor de fluorescencia correspondiente al nivel de corte

Fbl = Valor de fluorescencia correspondiente al límite inferior "zona gris".

- **Modo de informar**

- ✧ Las muestras **positivas** se repiten, si el resultado es Negativo se hacen por 3^{ra} vez, si es negativa sale como tal, si la 2^{da} vez es positiva se envía al Laboratorio de la Defensa Civil, donde se le realiza la prueba confirmativa.

PROCESAMIENTO TÉCNICO DE MUESTRA PARA HVC

Objetivos

- Conocer el procesamiento técnico de una muestra para HVC.

Alcance

- Las muestras de sangre para HVC se tomarán en la consulta externa del Servicio de Microbiología del policlínico, en el horario de 7.00-11.00 a.m. por el técnico de la consulta, a partir de esa hora son traídas al laboratorio

para su procesamiento. Las muestras a pacientes hospitalizados son tomadas por técnicos fijos que van a los pisos en el horario de 7.00-8.00 a.m. y traídas por los mismos al laboratorio. Ambas muestras (consulta y sala), se registrarán en el libro de la sección con la fecha correspondiente, sala, cama ó número de consulta externa.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- No procede nada específico, las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Alcohol
- Jeringuillas
- Tubos de vidrio limpios
- Centrífuga
- Incubadora
- Aire acondicionado
- Pipetas (10 mL)
- Pipetas de precisión entre 5-1000 microlitros
- Pipeta multicanal
- Probetas graduadas entre 10- 250 mL
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio
- Papel absorbente
- Puntas amarillas y azules para pipetas de precisión
- Reloj
- Termómetro
- Cámara húmeda
- Cubeta para desechar puntas
- Palanganas para lavado de placas
- Lavador automático MW-2001
- Equipo SUMA PR-521
- Computadora con impresora

Operaciones preliminares

- El producto patológico que se utiliza en la totalidad de las pruebas es el suero que se obtiene removiendo el coágulo formado en los tubos (sin anticoagulante) y dejando reposar alrededor de 20-30 min. a temperatura ambiente; para acelerar el proceso se puede colocar el suero a 37°C por unos minutos hasta que se produzca la retracción del coágulo. Posteriormente se centrifugan los tubos durante 10 min. a 3 000 rpm. y finalmente se extrae el suero con ayuda de una pipeta.

Procedimiento

Toma de muestra

- Se realizará por punción venosa con jeringuilla y aguja estéril, previa desinfección con alcohol 70 % de la zona. Después de la centrifugación y obtención del suero, se procederá a realizar el estudio.

UMELISA HBC

Reactivos

- Reactivo 1 (R1): solución tampón
- Reactivo 2 (R2): suero de carnero
- Reactivo 3 (R3): control negativo
- Reactivo 4 (R4): control positivo
- Reactivo 5 (R5): conjugado
- Reactivo 6 (R6): sustrato
- Reactivo 7 (R7): tampón sustrato

Preparación de las soluciones de trabajo

- **R1:** para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare solo lo necesario para el ensayo.
- **R2:** diluya 1:4 con solución de trabajo R1. Cantidad necesaria por tira: 2 ml (0,5 mL de R2 + 1,5 mL de R1). Prepare solo lo necesario para el ensayo.
- **R3:** listo para usar.
- **R4:** listo para usar
- **R5:** listo para usar (cantidad necesaria por tira: 0,2 mL)
- **R6:** diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira 0,5 ml (0,05 mL de R6 + 0,45 ml de R7. Prepare inmediatamente antes de usar y solo lo necesario para el ensayo.

Procedimiento técnico

Preparación de las muestras y controles

- Los

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	B	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	A
B	B	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	B
C	P	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	C

controles se presentan en los estuches listos para usar. La preparación de las muestras varía según se trate de muestras líquidas de suero o plasma, o de muestras de sangre seca sobre papel de filtro.

Procedimiento A: para muestras de suero.

- ⊞ Diluya las muestras 1:21 con la solución de trabajo R2 (5 µL de suero + 100 µL de la solución).

Procedimiento B: para las muestra de sangre colectadas en papel de filtro S & S 903.

- ⊞ Corte con un perforador para papel un disco de 5 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Deposítelo en un recipiente apropiado y añádale 70 µL de solución de trabajo R2. Mantenga como mínimo una hora a temperatura ambiente (20-25°C) y homogenice ocasionalmente.

- **Adición de las muestras y controles a la tira de reacción.** Se debe seguir el siguiente esquema de trabajo. (ver a continuación)

D	P	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	D
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	E
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	F
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89	G
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90	H

- ⊕ El **control positivo** (P) y el **control negativo** (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión. Como blanco (B) utilice la solución R2 de trabajo.
- ⊕ Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA HCV para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.
- **Incubación de las muestras y controles**
 - ⊕ **Procedimiento A:** incubar las tiras de reacción durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.
 - ⊕ **Procedimiento B:** incubar las tiras durante 1 h a temperatura ambiente (20-25°) en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.
- **Lavado** (utilice un lavador de la tecnología SUMA)
 - ⊕ Lave las tiras de reacción 4 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo. La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada la vado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.
- **Adición del conjugado**
 - ⊕ Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

- ***Incubación del conjugado***

- ⊕ Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37°C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

- ***Lavado***

- ⊕ Lave las tiras según se describe en el acápite 4.

- ***Adición del sustrato***

- ⊕ Coloque 10 microlitros de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de la tira de reacción.

- ***Incubación del sustrato***

- ⊕ Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°C). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 60 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las diferencias de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

- ***Lectura*** (se utiliza el equipo SUMA PR-521, según su manual de trabajo)

- ⊕ La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMELISA HVC o pueden realizarse manualmente por el operador siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

- ***Control de la calidad***

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

- ⊕ Al menos uno de los duplicados del blanco (B1 ó B2) debe tener un valor de fluorescencia menor de 10 unidades.
- ⊕ Al menos uno de los duplicados del control negativo (N1 ó N2) debe tener una fluorescencia que no supere en más de 10 unidades a la media del blanco.
- ⊕ Al menos uno de los duplicados de control positivo (P1 ó P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 60 y 180 unidades.

$$(NN - BB) / (P - BB) < 0.1$$

Donde:

NN: Valor promedio del control negativo

BB: Valor promedio del blanco

P: Menor valor de fluorescencia de los duplicados del control positivo que se encuentre dentro de los límites de calidad.

- ***Nivel de corte***

- ⊕ Las muestras de suero o las de sangre colectadas en papel de filtro se consideran **positivas** cuando:

$$(Fi-BB) / (P-BB) \geq 0,300$$

Fi = Fluorescencia de la muestra.

- ⊕ Las muestras se consideran en el **umbral de positividad** (BL), cuando sus resultados se encuentran en una zona comprendida entre el nivel de corte y 15 % por debajo del mismo ("zona gris").

Una muestra será "BL" cuando: $0,300 > (Fi-BB)/(PP-BB) \geq 0,255$

Para definir de una forma rápida el nivel de corte y el límite inferior de la "zona gris" cuando no se dispone de programa automático, se calcula el valor de fluorescencia correspondiente para cada caso.

$$Fnc = 0,300 (P-BB) + BB$$

$$Fbl = 0,255 (P-BB) + BB$$

Donde:

Fnc = Valor de fluorescencia correspondiente al nivel de corte

Fbl = Valor de fluorescencia correspondiente al límite inferior "zona gris".

- **Modo de informar**

- ⊕ Las muestras **positivas**, excepto cuando den cifras de valor máximo, hay que repetir las para obtener dos veces el mismo valor, ya sea positivo o negativo.

PROCESAMIENTO TÉCNICO DE MUESTRA PARA HBsAg

Objetivos

- Conocer el procesamiento técnico de una muestra para HBsAg.

Alcance

- Las muestras de sangre para HBsAg se tomarán en la consulta externa del Servicio de Microbiología del policlínico, en el horario de 7.00-11.00 a.m. por el técnico de la consulta, a partir de esa hora son traídas al laboratorio para su procesamiento. Las muestras a pacientes hospitalizados son tomadas por técnicos fijos que van a los pisos en el horario de 7.00-8.00 a.m. y traídas por los mismos al laboratorio. Ambas muestras (consulta y sala), se registrarán en el libro de la sección con la fecha correspondiente, sala, cama ó número de consulta externa.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- No procede nada específico, las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Alcohol
- Jeringuillas
- Tubos de vidrio limpios
- Centrífuga
- Incubadora
- Aire acondicionado
- Pipetas (10 mL)
- Pipetas de precisión entre 5-1000 microlitros
- Pipeta multicanal
- Probetas graduadas entre 10- 250 mL
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio
- Papel absorbente
- Puntas amarillas y azules para pipetas de precisión
- Reloj
- Termómetro
- Cámara húmeda
- Cubeta para desechar puntas
- Palanganas para lavado de placas
- Lavador automático MW-2001
- Equipo SUMA PR-521
- Computadora con impresora

Operaciones preliminares

- El producto patológico que se utiliza en la totalidad de las pruebas es el suero que se obtiene removiendo el coágulo formado en los tubos (sin anticoagulante) y dejando reposar alrededor de 20-30 min. a temperatura ambiente; para acelerar el proceso se puede colocar el suero a 37°C por unos minutos hasta que se produzca la retracción del coágulo. Posteriormente se centrifugan los tubos durante 10 min. a 3 000 rpm. y finalmente se extrae el suero con ayuda de una pipeta.

Procedimiento

Toma de muestra

- Se realizará por punción venosa con jeringuilla y aguja estéril, previa desinfección con alcohol 70 % de la zona. Después de la centrifugación y obtención del suero, se procederá a realizar el estudio.

UMELISA HbsAg Plus

Reactivos

- Reactivo 1 (R1): solución tampón
- Reactivo 2 (R2): control negativo
- Reactivo 3 (R3): control positivo
- Reactivo 4 (R4): Anticuerpos biotinilados
- Reactivo 5 (R5): conjugado
- Reactivo 6 (R6): sustrato
- Reactivo 7 (R7): tampón sustrato

Preparación de las soluciones de trabajo

- **R1:** para una tira de reacción, diluya 1 mL de la solución R1 hasta un volumen de 25 mL con agua destilada. Mezcle suavemente para evitar la formación excesiva de espuma. Prepare solo lo necesario para el ensayo.
- **R2:** listo para usar.
- **R3:** listo para usar
- **R4:** listo para usar (cantidad necesaria por tira: 0,2 mL)
- **R5:** listo para usar (cantidad necesaria por tira: 0,2 mL)
- **R6:** diluya 1:10 con R7. Cantidad necesaria por tira 0,5 mL (0,05 mL de R6 + 0,45 mL de R7. Prepare inmediatamente antes de usar y solo lo necesario para el ensayo.

Procedimiento técnico

Preparación de las muestras y controles

- Los controles se presentan en los estuches listos para usar. La preparación de las muestras varía según se trate de muestras líquidas de suero o plasma, o de muestras de sangre seca sobre papel de filtro.

Procedimiento A: para muestras de suero.

- ⊕ Diluya las muestras 1:21 con la solución de trabajo R2 (5 µL de suero + 100 µL de la solución).

Procedimiento B: para muestra de sangre colectadas en papel filtro S& S903

- ⊞ Corte con un perforador para papel un disco de 5 mm de diámetro en la zona central de la mancha de sangre. Deposítelo en un recipiente apropiado y añádale 70 µL de solución de trabajo R2. Mantenga como mínimo una hora a temperatura ambiente (20-25°C) y homogeneice ocasionalmente.
- **Adición de las muestras y controles a la tira de reacción.** Se debe seguir el siguiente esquema de trabajo. (ver a continuación)
 - ⊞ El **control positivo** (P) y el **control negativo** (N) deben añadirse de forma manual con una pipeta de precisión.
 - ⊞ Se recomienda evaluar las muestras por duplicado. Si utiliza el programa UMELISA HBsAg PLUS para la interpretación automática de los resultados, debe colocar en las posiciones 1 y 2 la primera muestra, en las posiciones 3 y 4 la segunda y así sucesivamente.
- **Incubación de las muestras y controles**
 - ⊞ **Procedimiento A:** incubar las tiras de reacción durante 30 minutos a 37°C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.
 - ⊞ **Procedimiento B:** incubar las tiras durante 1 h a temperatura ambiente (20-25°C) en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.
- **Lavado** (utilice un lavador de la tecnología SUMA)
 - ⊞ Lave las tiras de reacción 6 veces. Verifique el llenado total del pocillo con la solución R1 de trabajo (30 µL). La solución debe permanecer como mínimo 30 segundos en los pocillos en cada lavado. Después de la última aspiración seque las tiras sobre papel absorbente.
 - ⊞ El lavado incompleto influye negativamente en el resultado de la prueba. Se debe tener cuidado de no rayar la superficie interior del pocillo durante la operación de lavado.
- **Adición de los anticuerpos biotinilados**
 - ⊞ Con una punta nueva extraiga del frasco de anticuerpos biotinilados la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL de frasco de anticuerpos biotinilados en cada pocillo de la tira de reacción.
- **Incubación de los anticuerpos biotinilados**
 - ⊞ Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37°C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.
- **Lavado**
 - ⊞ Lave las tiras según se describe en el acápite 4.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	P	3	11	19	27	35	43	51	59	67	75	83	A
B	P	4	12	20	28	36	44	52	60	68	76	84	B
C	N	5	13	21	29	37	45	53	61	69	77	85	C
D	N	6	14	22	30	38	46	54	62	70	78	86	D
E	N	7	15	23	31	39	47	55	63	71	79	87	E
F	N	8	16	24	32	40	48	56	64	72	80	88	F
G	1	9	17	25	33	41	49	57	65	73	81	89	G
H	2	10	18	26	34	42	50	58	66	74	82	90	H

- **Adición del conjugado**

- ⊕ Con una punta nueva extraiga del frasco de conjugado la cantidad necesaria a emplear según el número de tiras del ensayo y deposítelo en un recipiente limpio. Añada 10 µL del conjugado en cada pocillo de reacción.

- **Incubación del conjugado.**

- ⊕ Incube las tiras de reacción 30 minutos a 37°C en cámara húmeda previamente equilibrada a esa temperatura.

- **Lavado**

- ⊕ Lave las tiras según se describe en el acápite 4.

- **Adición del sustrato**

- ⊕ Coloque 10 microlitros de sustrato convenientemente diluido en cada pocillo de la tira de reacción.

- **Incubación del sustrato**

- ⊕ Incube 30 minutos en cámara húmeda a temperatura ambiente (20-25°C). En estas condiciones se garantiza una señal de fluorescencia del Control Positivo entre 75 y 180 unidades. Sin embargo, debido a las diferencias de temperatura se recomienda que cada laboratorio establezca su propio tiempo de incubación óptimo.

- **Lectura** (se utiliza el equipo SUMA PR-521, según su manual de trabajo)

- ⊕ La validación, interpretación de resultados y su impresión, son efectuados automáticamente por el lector SUMA con el programa UMEHISA HbsAg

Plus PLUS o pueden realizarse manualmente por el operador siguiendo las instrucciones que se describen a continuación.

- **Control de la calidad**

Las condiciones mínimas requeridas para asegurar la calidad del ensayo son las siguientes:

- ⊕ Al menos uno de los duplicados del Control Positivo (P1 ó P2) debe tener un valor de fluorescencia entre 75 y 180 unidades.
- ⊕ Al menos dos de los duplicados del Control Negativo (N1 ó N2) debe tener una fluorescencia entre 1 y 7 unidades.
- ⊕ El cumplimiento de estos requisitos garantiza la detección de 0,125 UPE/mL de HBsAg, para los subtipos ad y ay del VHB y 0,325 UI/mL, para el subtipo ad, según estándar secundario calibrado frente al patrón internacional de la OMS (IRP 80/549), en muestras de suero o plasma.
- ⊕ En el caso de muestras de sangre seca sobre papel de filtro, el cumplimiento de estas condiciones garantiza la detección de 1 UPE/mL de HBsAg, para los subtipos **ad** y **ay** del VHB.

- **Nivel de corte**

- ⊕ Las muestras de suero o las de sangre colectadas en papel de filtro se consideran **positivas** cuando:

$$(Fi-NN) / (P-NN) \geq 0,03$$

Donde:

P = duplicado del Control Positivo con menor fluorescencia, que se encuentre dentro de los límites de calidad.

NN = mediana de los Controles Negativos que se encuentran dentro de los límites de calidad.

Fi = Fluorescencia de la muestra.

Para definir de una forma rápida el nivel de corte cuando no se dispone de programa automático, se calcula el valor de fluorescencia correspondiente para cada caso de la siguiente forma:

$$0,03 (P-NN) + NN$$

- **Modo de informar**

- ⊕ Las muestras **positivas** se repiten y posteriormente se les hace el estudio confirmativo para Hepatitis B por la misma técnica (SUMA).

Cálculo e interpretación de los resultados

- ⊕ No procede, lo hace el equipo.

PROCESAMIENTO TÉCNICO PARA LA CONFIRMACIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS CON EL UMELISA HBsAg

Objetivos

- Conocer el procedimiento técnico para el test confirmativo de HBsAg.

Alcance

- Ver marchas técnicas para HBsAg.

Responsabilidades

- Técnico que trabaja en la sección y profesional que atiende el cubículo.

Condiciones de bioseguridad

- No procede nada específico, las mismas generales del laboratorio.

Equipos y materiales

- Alcohol
- Jeringuillas
- Tubos de vidrio limpios
- Centrífuga
- Incubadora
- Aire acondicionado
- Pipetas (10 mL)
- Pipetas de precisión entre 5-1000 microlitros
- Pipeta multicanal
- Probetas graduadas entre 10- 250 mL
- Agua destilada
- Hipoclorito de sodio
- Papel absorbente
- Puntas amarillas y azules para pipetas de precisión
- Reloj
- Termómetro
- Cámara húmeda
- Cubeta para desechar puntas
- Palanganas para lavado de placas
- Lavador automático MW-2001

- Equipo SUMA PR-521
- Computadora con impresora

Operaciones preliminares

Procedimiento

• **Preparación del Control Positivo y las muestras**

- ⊕ El Control Positivo se presenta en el estuche listo para usar. Las muestras se deben analizar sin diluir y diluidas 1:101 (10 µL de muestra + 1000 µL de solución de cloruro sódico 0,9 %). Mezcle cada muestra, sin diluir y diluida 1:101, en una proporción 5:1 con los Reactivos Control (R1) y Neutralizante (R2).

Volumen recomendado:

- 100 µL de muestra + 20 µL de R1.
- 100 µL de muestra + 20 µL de R2.

Incluya en cada ensayo el Control Positivo tratado como una muestra sin diluir

• **Preincubación con los Reactivos Control y Neutralizante.**

- ⊕ Incube durante 16-24 h a 20 - 25°C.
- ⊕ La incubación se puede llevar a cabo en cámara húmeda en caso de no utilizarse recipientes herméticamente cerrados.

• **Realización de la técnica inmunoenzimática.**

- ⊕ Utilice el juego de reactivos del UMELISA HBsAg.

La distribución de las muestras controles se hará como sigue:

(Las posiciones marcadas corresponden a las muestras diluidas 1:101 y las no marcadas a las muestras sin diluir. Se recomienda analizar las muestras, diluidas y sin diluir por duplicado)

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
A	Pc	M1c	M3c	M5c	M7c	M9c	M11c	M13c	M15c	M17c	M19c	M21c	A
B	Pc	M1n	M3n	M5n	M7n	M9n	M11n	M13n	M15n	M17n	M19n	M21n	B
C	Pc	M1c	M3c	M5c	M7c	M9c	M11c	M13c	M15c	M17c	M19c	M21c	C
D	Pc	M1n	M3n	M5n	M7n	M9n	M11n	M13n	M15n	M17n	M19n	M21n	D
E	Pn	M2c	M4c	M6c	M8c	M10c	M12c	M14c	M16c	M18c	M20c	M22c	E
F	Pn	M2n	M4n	M6n	M8n	M10n	M12n	M14n	M16n	M18n	M20n	M22n	F
G	Pn	M2c	M4c	M6c	M8c	M10c	M12c	M14c	M16c	M18c	M20c	M22c	G
H	Pn	M2n	M4n	M6n	M8n	M10n	M12n	M14n	M16n	M18n	M20n	M22n	H

Donde:

Pc: Control Positivo tratado con R1.

Pn: Control Positivo tratado con R2.

Mc: Muestra tratada con R1.

Mn: Muestra tratada con R2.

Control de la calidad

Se obtiene la óptima calidad del ensayo si cumple los criterios siguientes:

- **PN / PC < 0,5**

Donde:

PN: Mediana de la fluorescencia del control positivo tratado con R2.

PC: Mediana de la fluorescencia del control positivo tratado con R1.

- PC \geq que 75 unidades de fluorescencia.
- PN: De 1 a 15 unidades de fluorescencia.

Interpretación de los resultados

- Una muestra se considera **HBsAg POSITIVO** si diluida o sin diluir cumple con la siguiente condición:
 $Mn \leq 0.7 Mc$ y $Mc \geq 4$ unidades de fluorescencia.
- Una muestra se considera **HBsAg NEGATIVO** en todos los demás casos, excepto cuando la muestra diluida tratada con R1 presenta valores de fluorescencia mayores de 150 unidades, en tal caso el resultado no es válido y la muestra se debe **DILUIR**.

TÉCNICA SEROLÓGICAS POR MINI-VIDAS

Técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) para diagnóstico de anticuerpos IgM contra citomegalovirus (IgGM CMV)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgM contra el citomegalovirus.

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infecciones por herpes virus y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de estas infecciones que sean solicitadas por el médico de asistencia.

Definiciones

- El CMV perteneciente a la familia herpes viridae, es un problema potencial para todos los inmunodeprimidos ya que es una de las causas más comunes de infección oportunista refractaria, complica el trasplante de órganos y constituye una de las causas más frecuentes de infección viral prenatal. Este virus es altamente especie específico, el hombre es el único reservorio. Establece infecciones latentes en glándulas secretorias, células linforeticulares, riñones y otros tejidos.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Cartuchos CMVM
- Conos CMVM
- Control positivo
- Control negativo
- Calibrador CMVM
- Tarjeta MLE
- Ficha
- Equipo MINI VIDAS

Material necesario no suministrado

- Pipeta de punta desechable de 100 uL
- Guantes sin talco de un solo uso.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2...8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- El principio de determinación asocia el método inmunoenzimático sándwich en 2 etapas con una detección final por fluorescencia (ELFA).
- Todas las etapas de la determinación se realizan automáticamente por el sistema. Están constituidas por una sucesión de ciclos de aspiración/expulsión del medio reaccional.

- Después de una etapa de adsorción de las IgG y del factor reumatoide, la muestra es aspirada y expulsada del interior del cono durante un tiempo determinado. Los anticuerpos IgM anti-CMV presentes en la muestra van a fijarse al antígeno CMV fijado sobre la pared interna del cono. Las etapas de lavado eliminan los componentes no unidos.
- Un anticuerpo monoclonal anti-IgM humano marcado con fosfatasa alcalina es aspirado y expulsado del interior del cono y se une a las IgM anti-CMV humanas unidas sobre la pared del cono. Una última etapa de lavado elimina los componentes no unidos.
- Durante la etapa final de revelado, el sustrato (4-Metilumbeliferil fosfato) es aspirado después expulsado del cono; el enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en un producto (4-Metilumbeliferona) cuya fluorescencia emitida es medida a 450 nm. Al finalizar la prueba, los resultados se calculan automáticamente por el sistema respecto a una curva de calibración memorizada, después se imprimen.

Procedimiento*

(*) Para instrucciones completas, referidas al Manual de Utilización del VIDAS o mini-VIDAS.

Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Introducción de los datos de la tarjeta MLE

Cuando se abra un nuevo lote, las especificaciones (o datos de fabricación) deben ser introducidas en el sistema (mini VIDAS) con la ayuda de la tarjeta MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada equipo. Si esta operación no se realiza **antes de comenzar las determinaciones**, el sistema no podrá editar los resultados. Estas especificaciones se introducen una única vez para cada lote.

Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.

Calibración

La calibración con la ayuda del calibrador incluido en el equipo, debe efectuarse cuando se abra un nuevo lote después de introducir las especificaciones del lote y cada 14 días. Esta operación permite ajustar la calibración a cada instrumento y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.

El calibrador, identificado por S1, se analiza en doble (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Valor de Fluorescencia Relativo") fijados. Si no es este el caso: repetir la calibración.

Realización de la prueba

- **Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarles 30 minutos a temperatura ambiente antes de utilizar.**
- Sacar del equipo un cartucho CMVM y un cono CMVM para cada muestra, control o calibrador a analizar. **Verificar que la bolsa de los conos está bien cerrada después de cada utilización.**
- Teclear y seleccionar "CMVM" sobre el sistema para introducir el código de la prueba. El calibrador identificado obligatoriamente por "S1" debe utilizarse **en doble**. Si debe procesarse el control positivo, se identificará por C1. Si debe procesarse el control negativo, se identificará por C2.
- Homogenizar bien con la ayuda de un agitador tipo vortex las muestras, el calibrador y/o los controles.
- Distribuir **100 µl** de muestra, calibrador y controles.
- Colocar en el instrumento los conos y los cartuchos. Verificar la concordancia de los códigos (colores y letras) entre el cono y el cartucho.
- Iniciar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas son creadas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 60 minutos.
- Al finalizar el análisis retirar los conos y los cartuchos del instrumento.
- Eliminar los conos y los cartuchos utilizados en un recipiente adecuado.

Resultados e interpretación

Una vez finalizada la prueba, los resultados se analizarán automáticamente por el sistema informático. El sistema efectúa dos medidas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada prueba. La primera lectura tiene en cuenta el ruido de fondo debido a la cubeta de substrato antes de ponerse en contacto el substrato con el cono. La segunda lectura se efectúa después de la incubación del substrato con la enzima presente en el cono. El cálculo del RFV ("Valor de Fluorescencia Relativo") es el resultado de la diferencia de las dos lecturas. Aparece sobre la hoja de resultados.

El índice de la prueba (relación de la señal fluorescente del suero a analizar respecto a la señal memorizada del calibrador) es calculado por el sistema.

Este índice así como la interpretación figuran sobre la hoja de resultados.

Umbral e interpretación de los resultados

Índice	Interpretación
$i < 0.70$	Negativo
$0.70 \leq i < 0.90$	Dudoso
$i \geq 0.90$	Positivo

Para índices comprendidos entre 0.70 y 0.90 repetir la prueba. Si la verificación da una interpretación dudosa, repetir el análisis con una nueva muestra tomada 10 a 15 días más tarde.

La interpretación de los resultados de la prueba debe hacerse teniendo en cuenta el contexto clínico y eventualmente los resultados de otras pruebas.

No existe ningún estándar internacional disponible para la determinación de las IgM anti-CMV, el reactivo VIDAS CMV IgM está calibrado respecto a sueros de seroteca.

Técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) para el diagnóstico de las IgM anti-toxoplásmicas en suero

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgM contra el parásito *Toxoplasma gondii*

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infección por toxoplasma y de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de esta infección que sea solicitada por el médico de asistencia.

Definiciones

- El *Toxoplasma* infecta a toda clase de mamífero y aves. Es el parásito intracelular mas ampliamente distribuido. Los seres humanos se infectan a través de la contaminación con heces fecales, carne mal cocinada o por inoculación directa a través de transfusiones o transmisión congénita.
- Las mujeres embarazadas que adquieren la infección durante el primer trimestre tienen 25 % de riesgo de transmisión fetal que resulta en abortos espontáneos, enfermedad aparente o enfermedad severa. Sesenta y cinco por ciento de los niños nacidos de madres infectadas durante el tercer trimestre tienen infección subclínica, desarrollando finalmente el 85 % coriorretinitis o secuelas neurológicas.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Cartuchos TXM
- Conos TXM

- Control positivo
- Control negativo
- Calibrador TXM
- Tarjeta MLE
- Ficha técnica
- Equipo MINI VIDAS

Material necesario no suministrado

- Pipeta de punta desechable de 100 uL
- Guantes sin talco de un solo uso.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2...8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- El principio de determinación asocia el método inmunoenzimático de inmunocaptura con una detección final por fluorescencia (ELFA).
- Todas las etapas de la determinación se realizan automáticamente por el sistema. Están constituidas por una sucesión de ciclos de aspiración/expulsión del medio reaccional.
- Después de una etapa de dilución del suero, las IgM son capturadas por el Ac policlonal presente sobre la pared del cono. Las IgM anti-Toxoplásmicas son detectadas específicamente por el antígeno toxoplásmico inactivado (cepa RH Sabin), y se relevan por un anticuerpo monoclonal murino anti-toxoplásmico (anti-P30), conjugado con la fosfatasa alcalina.
- Durante la etapa final de revelado, el sustrato (4-Metilumbeliferil fosfato) es aspirado después expulsado del cono; el enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en un producto (4-Metilumbeliferona) cuya fluorescencia emitida es medida a 450 nm. Al finalizar la prueba, los resultados se calculan automáticamente por el sistema respecto a una curva de calibración memorizada, después se imprimen.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Técnica*

(*) Para instrucciones completas referidas al Manual de Utilización del VIDAS o mini VIDAS

- **Introducción de los datos de la tarjeta MLE**

Cuando se abra un nuevo lote, las especificaciones (o datos de fabricación) deben ser introducidas en el sistema (mini VIDAS) con la ayuda de la tarjeta MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada equipo. Si esta operación no se realiza **antes de comenzar las determinaciones**, el sistema no podrá editar los resultados. Estas especificaciones se introducen una única vez para cada lote.

Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.

- **Calibración**

La calibración con la ayuda del calibrador incluido en el equipo, debe efectuarse cuando se abra un nuevo lote después de introducir las especificaciones del lote y cada 14 días. Esta operación permite ajustar la calibración a cada instrumento y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.

El calibrador, identificado por S1, se analiza en doble (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV (*valor de Fluorescencia relativo*) fijados. Si no es este el caso: repetir la calibración.

Realización de la prueba

- **Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarles 30 minutos a temperatura ambiente antes de utilizar.**
- Sacar del equipo un cartucho TXM y un cono TXM para cada muestra, control o calibrador a analizar. **Verificar que la bolsa de los conos está bien cerrada después de cada utilización.**
- Teclear y seleccionar "TXM" sobre el sistema para introducir el código de la prueba. El calibrador identificado obligatoriamente por "S1" debe utilizarse **en doble**. Si debe procesarse el control positivo, se identificará por C1. Si debe procesarse el control negativo, se identificará por C2.
- Homogenizar bien con la ayuda de un agitador tipo vortex las muestras, el calibrador y/o los controles.
- Distribuir **100 µl** de muestra, calibrador y controles.
- Colocar en el instrumento los conos y los cartuchos. Verificar la concordancia de los códigos (colores y letras) entre el cono y el cartucho.
- Iniciar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas son creadas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 40 minutos.

- Al finalizar el análisis retirar los conos y los cartuchos del instrumento.
- Eliminar los conos y los cartuchos utilizados en un recipiente adecuado.

Resultados e interpretación

- Una vez finalizada la prueba, los resultados se analizarán automáticamente por el sistema informático. El sistema efectúa dos medidas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada prueba. La primera lectura tiene en cuenta el ruido de fondo debido a la cubeta de sustrato antes de ponerse en contacto el sustrato con el cono. La segunda lectura se efectúa después de la incubación del sustrato con la enzima presente en el cono. El cálculo del RFV ("Valor de Fluorescencia Relativo") es el resultado de la diferencia de las dos lecturas. Aparece sobre la hoja de resultados.

El índice de la prueba (relación de la señal fluorescente del suero a analizar respecto a la señal memorizada del calibrador) es calculado por el sistema.

Este índice así como la interpretación figuran sobre la hoja de resultados.

Umbral e interpretación de los resultados

Índice	Interpretación
$i < 0.55$	Negativo
$0.55 \leq i < 0.65$	Dudoso
$i \geq 0.65$	Positivo

- Para índices comprendidos entre 0.55 y 0.65 repetir la prueba. Si la verificación da una interpretación dudosa, repetir el análisis con una nueva muestra tomada 10 a 15 días más tarde.
- La interpretación de los resultados de la prueba debe hacerse teniendo en cuenta el contexto clínico y eventualmente los resultados de otras pruebas.
- No existe ningún estándar internacional disponible para la determinación de las IgM anti-toxoplásmico el reactivo VIDAS TXM IgM está calibrado respecto a sueros de seroteca.

Técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) para detección combinada de inmunoglobulinas totales anti-VHI-1 (Grupo M y O) y anti-VHI-2 y del antígeno P24 de VHI-1

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de antígeno y anticuerpos contra el virus del VHI.

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes hospitalizados con sospecha clínica de esta infección que sean solicitadas por el médico de asistencia, con la posibilidad de período de ventana, y autorizados por el jefe de servicio.

Definiciones

- El Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) es una enfermedad infecciosa de etiología viral, producida por el Virus de la Inmunodeficiencia Humana (HVI). Esta puede ser transmitida a través del contacto sexual, la exposición a sangre o sus derivados o por la utilización de materiales tales como agujas y jeringuillas contaminados; se ha demostrado también su transmisión de la madre al feto o al recién nacido durante el período perinatal.

La presencia de anticuerpos contra el VIH en suero o plasma de una persona, indica que la misma ha estado expuesta a dicho virus, y por tanto, constituye un transmisor potencial de la enfermedad.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Cartuchos HVI5
- Conos HVI5
- Control positivo
- Control negativo
- Estándar anticuerpos HVI5
- Estándar antígeno HVI5
- Barrita de cierre
- Tarjeta MLE
- Ficha
- Equipo MINI VIDAS

Material necesario no suministrado

- Pipeta de punta desechable de 200 uL
- Guantes sin talco de un solo uso.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2...8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- El principio de determinación asocia dos reacciones inmunoenzimática con una detección final por fluorescencia (ELFA).
- Todas las etapas de la determinación se realizan automáticamente por el sistema. Están constituidas por una sucesión de ciclos de aspiración/expulsión del medio reaccional.
- La parte superior del cono permite la detección del Ag p24, gracias a una sensibilización por anticuerpos monoclonales anti-p24. La parte inferior del cono permite la detección de los anticuerpos anti-VHI-1 y anti-VHI-2: está sensibilizada por una proteína gp160 de VHI-1 y por péptidos de síntesis específicos del VHI-1 grupo O y del VHI-2.
- Durante una primera incubación, la muestra, los anticuerpos de conejo anti-p24 biotinilados presentes en el cartucho son aspirados y expulsados del cono. Durante esta incubación, el virus es lisado y los antígenos p24 liberados se unen con los anticuerpos monoclonales anti-p24 fijados en el cono y son reconocidos por los anticuerpos anti-p24 biotinilados. Al mismo tiempo, los anticuerpos anti-VHI-1 y/o anti-VIH-2 se unen a la gp160 y/o a los péptidos presentes en la parte inferior del cono.
- Las etapas de lavado eliminan los compuestos no unidos.
- Una segunda incubación con los antígenos biotinilados presentes en el cartucho (los mismos a los utilizados para la sensibilización) se realiza solo en la parte inferior del cono. Estos antígenos biotinilados se unen a los anticuerpos anti-VIH eventualmente presentes en la parte inferior del cono.
- El reactivo en exceso se elimina por las etapas de lavado.
- Una tercera incubación se efectúa con la estreptavidina marcada con la fosfatasa alcalina. En esta etapa, la estreptavidina se fija a los anticuerpos anti-p24 biotinilados si están presentes en la parte superior del cono y los antígenos biotinilados si están presentes en la parte inferior del cono.
- El reactivo en exceso se elimina por las etapas de lavado.
- Durante la etapa final de revelado, el sustrato (4-Metilumbeliferil fosfato) es aspirado después expulsado del cono; el enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en un producto (4-Metilumbeliferona) cuya fluorescencia emitida es medida a 450 nm. Al finalizar la prueba, los resultados se calculan automáticamente por el sistema respecto a una curva de calibración memorizada, después se imprimen.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Técnica

(*) Para instrucciones completas referidas al Manual de Utilización del VIDAS o mini VIDAS

Introducción de los datos de la tarjeta MLE

- Cuando se abra un nuevo lote, las especificaciones (o datos de fabricación) deben ser introducidas en el sistema (mini VIDAS) con la ayuda de la tarjeta MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada equipo. Si esta operación no se realiza **antes de comenzar las determinaciones**, el sistema no podrá editar los resultados. Estas especificaciones se introducen una única vez para cada lote.
- Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.
- Para que el sistema pueda verificar los valores de los controles, deben identificarse el control positivo de anticuerpo por C1, el control negativo por C2, el control positivo de antígeno por C3, el estándar de anticuerpos por S1 y el estándar de antígeno p24 por S2.

Calibración

- La calibración con la ayuda de los estándares S1 y S2 incluido en el equipo, debe efectuarse cuando se abra un nuevo lote después de introducir las especificaciones del lote y cada 14 días. Esta operación permite ajustar la calibración a cada instrumento y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.
- El calibrador, identificado por S1 y S2, se analizarán en doble (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Valor de Fluorescencia Relativo") fijados. Si no es este el caso: repetir la calibración.

Realización de la prueba.

- **Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarles 30 minutos a temperatura ambiente antes de utilizar.**
- Sacar del equipo un cartucho "HIV5" y un cono "HIV5" para cada muestra, control o calibrador a analizar. **Verificar que la bolsa de los conos está bien cerrada después de cada utilización.**
- Teclar y seleccionar "HIV5" sobre el sistema para introducir el código de la prueba. El calibrador identificado obligatoriamente por "S1 y S2" debe utilizarse **en doble**. Si debe procesarse los controles positivos, se identificará por C1 y C3. Si debe procesarse el control negativo, se identificará por C2.

- Homogenizar bien con la ayuda de un agitador tipo vortex las muestras, el calibrador y/o los controles.
- Distribuir **200 µl** de muestra, calibrador y controles.
- Colocar en el instrumento los conos y los cartuchos. Verificar la concordancia de los códigos (colores y letras) entre el cono y el cartucho.
- Iniciar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas son creadas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 2 horas.
- Al finalizar el análisis retirar los conos y los cartuchos del instrumento.
- Eliminar los conos y los cartuchos utilizados en un recipiente adecuado.

Resultados e interpretación

- Una vez finalizada la prueba, los resultados se analizarán automáticamente por el sistema informático. El sistema efectúa dos medidas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada prueba. La primera lectura tiene en cuenta el ruido de fondo debido a la cubeta de sustrato antes de ponerse en contacto el sustrato con el cono.
- La segunda lectura se efectúa para la detección de los anticuerpos anti-VIH después de incubar el sustrato con el enzima presente en la parte inferior del cono.
- La tercera lectura se efectúa para la detección del antígeno p24 de VIH -1 después de incubar el sustrato con la totalidad del cono.
- Los RFV aparecen en la hoja de resultados.
- El índice de la prueba (relación de la señal fluorescente del suero a analizar respecto a la señal memorizada del calibrador) es calculado por el sistema.
- Este índice así como la interpretación figuran sobre la hoja de resultados.

Umbral e interpretación de los resultados

Valor de la prueba	Interpretación
<0.25 (para detección antígeno y anticuerpos)	Negativo
≥0.25 (para detección de antígeno y anticuerpos)	Positivo

- La obtención de RFV elevados para la detección de anticuerpos puede enmascarar la respuesta del antígeno y vice-versa. Para la respuesta enmascarada, el valor de la prueba no es visualizada, aparece el mensaje N.D. "**No Determinable**" en su lugar. En este caso, la interpretación permanece válida.

- La aparición de mensaje "**Incorrecto**" a nivel de la interpretación de la muestra inválida todo resultado para esta muestra. En este caso, esta muestra debe ser repetida.
- Las muestras para las cuales la interpretación es negativa se consideran negativas en el límite de las prestaciones del reactivo. En el caso, de sospecha de una de una primo-infección, los valores próximos a 0.25 deben ser interpretados con prudencia.
- Las muestras para los cuales la interpretación es positiva deben ser repetidas en doble:
 - Las muestras positivas iniciales no repetibles (dos reacciones negativas de tres pruebas) deben ser consideradas como negativas en el límite de las prestaciones del reactivo.
 - Las muestras positivas repetibles (al menos dos reacciones positivas de tres pruebas) deben ser confirmadas por métodos complementarios.

La positividad para una de dos respuestas es una ayuda para la elección de los métodos complementarios:

- Si el valor de la prueba para la detección de anticuerpos es ≥ 0.25 , la prueba complementaria puede ser el análisis por Western-Blot y/o la utilización de una segunda técnica de cribado de los anticuerpos anti-VIH. Si estas pruebas complementarias son negativas, se aconseja el análisis en una segunda muestra efectuada algunos días después sobretodo en presencia de signos clínicos y/o factores de riesgo.
- Si el valor de la prueba para la detección del antígeno es ≥ 0.25 , la prueba complementaria debe estar basada en la detección del antígeno p24 y/o en la determinación de la carga viral.

La interpretación de los resultados de la prueba debe hacerse teniendo en cuenta el contexto clínico y eventualmente los resultados de otras pruebas.

Técnica ELFA (Enzyme Linked Fluorescent Assay) para detección mediante inmunocaptura, de las IgM dirigidas contra el virus de la hepatitis A (VHA)

Objetivo

- Determinar la presencia en suero de anticuerpos de tipo IgM contra el virus de la hepatitis A.

Alcance

- Se realizará a muestras de sangre llegadas al laboratorio con las condiciones requeridas provenientes de pacientes incluidos en protocolos de trasplantes, pacientes trasplantados para seguimiento de infección por toxoplasma y de

pacientes hospitalizados con sospecha clínica de esta infección que sea solicitada por el médico de asistencia.

Definiciones

- La Hepatitis A es causada por el virus de la hepatitis A, de la familia de los picornavirus. Puesto que la transmisión es enteral, la hepatitis A era considerada una enfermedad de la infancia, la mayoría de las veces asintomática.

Responsabilidades

- Técnico y profesional que atienden el cubículo.

Condiciones de seguridad y bioseguridad

- Remitirse a las normas de seguridad y bioseguridad del laboratorio.

Equipos, materiales y reactivos

- Cartuchos HAVM
- Conos HVAM
- Control positivo
- Control negativo
- Calibrador HAVM
- Tarjeta MLE
- Ficha técnica
- Equipo MINI VIDAS

Material necesario no suministrado

- Pipeta de punta desechable de 100 uL
- Guantes sin talco de un solo uso.

Operaciones preliminares

- La toma de muestra de sangre se realizará siguiendo los requerimientos señalados en el manual de toma de muestras. Se extraerán 5 mL de sangre que se colocarán en tubo de 13 x 100 estéril para ser centrifugada a 10 000 rpm, el suero se colocará en vial estéril y se almacenará hasta por 7 días de 2...8 °C o por más largo tiempo a -20 °C. **Congelar solamente una vez.**

Fundamento

- El principio de determinación asocia el método inmunoenzimático de inmunocaptura con una detección final por fluorescencia (ELFA).
- Todas las etapas de la determinación se realizan automáticamente por el sistema. Están constituidas por una sucesión de ciclos de aspiración/expulsión del medio reaccional.

- Después de una etapa de dilución del suero, las IgM son capturadas por el Ac policlonal anti-cadena μ fijados en el cono.
- Las IgM dirigidas contra el virus de la hepatitis A son detectadas específicamente por un inmunocomplejo formado por un antígeno viral inactivado y por un anticuerpo monoclonal anti-VHA conjugado con fosfatasa alcalina. El inmunocomplejo no fijado es eliminado mediante lavados.
- Durante la etapa final de revelado, el sustrato (4-Metilumbeliferil fosfato) es aspirado después expulsado del cono; el enzima del conjugado cataliza la reacción de hidrólisis de este sustrato en un producto (4-Metilumbeliferona) cuya fluorescencia emitida es medida a 450 nm. Al finalizar la prueba, los resultados se calculan automáticamente por el sistema respecto a una curva de calibración memorizada, después se imprimen.

Procedimiento

- Todos los reactivos, incluyendo la muestra del paciente se deben llevar a temperatura ambiente antes de comenzar la prueba.

Técnica

(*) Para instrucciones completas referidas al Manual de Utilización del VIDAS o mini VIDAS

Introducción de los datos de la tarjeta MLE

- Cuando se abra un nuevo lote, las especificaciones (o datos de fabricación) deben ser introducidas en el sistema (mini VIDAS) con la ayuda de la tarjeta MLE (ficha de especificaciones) incluida en cada equipo. Si esta operación no se realiza **antes de comenzar las determinaciones**, el sistema no podrá editar los resultados. Estas especificaciones se introducen una única vez para cada lote.
- Es posible introducir las especificaciones manualmente o de forma automática gracias a la tarjeta MLE.

Calibración

- La calibración con la ayuda del calibrador incluido en el equipo, debe efectuarse cuando se abra un nuevo lote después de introducir las especificaciones del lote y cada 14 días. Esta operación permite ajustar la calibración a cada instrumento y a la eventual evolución del reactivo en el tiempo.
- El calibrador, identificado por S1, se analiza en doble (ver Manual de Utilización). El valor del calibrador debe estar comprendido en los límites de RFV ("Valor de Fluorescencia Relativo") fijados. Si no es este el caso: repetir la calibración.

Realización de la prueba

- **Sacar únicamente los reactivos necesarios, dejarles 30 minutos a temperatura ambiente antes de utilizar.**

- Sacar del equipo un cartucho HAVM y un cono HAVM para cada muestra, control o calibrador a analizar. **Verificar que la bolsa de los conos está bien cerrada después de cada utilización.**
- Teclear y seleccionar "HAVM" sobre el sistema para introducir el código de la prueba. El calibrador identificado obligatoriamente por "S1" debe utilizarse **en doble**. Si debe procesarse el control positivo, se identificará por C1. Si debe procesarse el control negativo, se identificará por C2.
- Homogenizar bien con la ayuda de un agitador tipo vortex las muestras, el calibrador y/o los controles.
- Distribuir **100 µl** de muestra, calibrador y controles.
- Colocar en el instrumento los conos y los cartuchos. Verificar la concordancia de los códigos (colores y letras) entre el cono y el cartucho.
- Iniciar el análisis (ver Manual de Utilización). Todas las etapas son creadas automáticamente por el sistema. Los resultados se obtienen en aproximadamente 60 minutos.
- Al finalizar el análisis retirar los conos y los cartuchos del instrumento.
- Eliminar los conos y los cartuchos utilizados en un recipiente adecuado.

Resultados e interpretación

Una vez finalizada la prueba, los resultados se analizarán automáticamente por el sistema informático. El sistema efectúa dos medidas de fluorescencia en la cubeta de lectura para cada prueba. La primera lectura tiene en cuenta el ruido de fondo debido a la cubeta de sustrato antes de ponerse en contacto el sustrato con el cono. La segunda lectura se efectúa después de la incubación del sustrato con la enzima presente en el cono. El cálculo del RFV ("Valor de Fluorescencia Relativo") es el resultado de la diferencia de las dos lecturas. Aparece sobre la hoja de resultados.

La RFV del paciente es interpretada por el sistema VIDAS del modo siguiente:

$$i = \text{valor de la prueba} = \text{RFV paciente} / \text{RFV calibrador}$$

Este índice así como la interpretación figuran sobre la hoja de resultados.

Umbral e interpretación de los resultados

Índice	Interpretación
$i < 0.4$	Negativo
$i \geq 0.4$ e $i < 0.5$	Equivoca ^{**}
$i \geq 0.5$	Positivo

^{**} Se aconseja comprobar los resultados equivocados en una 2da muestra.

La interpretación de los resultados de la prueba debe hacerse teniendo en cuenta el contexto clínico y eventualmente los resultados de otras pruebas.

Por las técnica sexológicas por mini-vidas se puede determinar además:

- VIDAS HBsAg Ultra
- VIDAS HBe/Anti-Be (HBE/HBET)
- VIDAS Anti-HBc Total II (HBCT)
- VIDAS Chlamydia (CHL)

Siguiendo las instrucciones del fabricante.