



## Resolución Directoral

Santa Anita, 28 de Diciembre de 2015

Visto el Memorando N° 306-DAD-HHV-2015 y Expediente N° 15MP-09215-00, sobre aprobación del Manual de Procedimientos de Inmunología 2015, del Hospital Hermilio Valdizán;

### CONSIDERANDO:

Que, el Artículo VI del Título Preliminar de la Ley N° 26842, Ley General de Salud, establece que es responsabilidad del Estado promover las condiciones que garanticen una adecuada cobertura de prestaciones de salud a la población, en términos socialmente aceptables de seguridad, oportunidad y calidad;

Que, el Artículo 44° del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital Hermilio Valdizán, aprobado por R.M. N° 797-2003-SA/DM, establece como objetivos funcionales del Departamento de Apoyo al Diagnóstico, entre otros, efectuar los exámenes analíticos hematológicos, bioquímicos, inmunológicos y microbiológicos solicitados por los médicos, así como proponer, ejecutar y evaluar los protocolos y procedimientos de apoyo al diagnóstico y de atención psicológica, orientados a brindar un servicio eficiente, eficaz y con calidad;

Que, mediante Memorando del visto, de fecha 20 de julio del 2015, el Jefe del Departamento de Apoyo al Diagnóstico presenta a la Dirección General del Hospital, el Manual de Procedimientos de Inmunología 2015 del Hospital Hermilio Valdizán, a fin de ser aprobado mediante el correspondiente acto resolutorio; el cual consta de cincuenta y uno (51) páginas y desarrolla en su contenido la finalidad, el objetivo, base legal, ámbito de aplicación, responsabilidades, entre otros;

Que, el citado Manual tiene como finalidad uniformizar los procedimientos de diagnóstico serológico de las principales enfermedades inmunológicas estandarizadas en el servicio de laboratorio del Hospital Hermilio Valdizán, a fin que pueda convertirse en una herramienta útil para la capacitación del personal que integra nuestra institución; y, como objetivos, establecer los procedimientos y criterios para el control de calidad interno en las pruebas de inmunoserología; servir como documento de consulta en los procesos y procedimientos de inmunoserología y control de calidad, entre otros; por cuyos motivos resulta necesario expedir el respectivo acto resolutorio;

En uso de las facultades conferidas por el Artículo 11° Inc. c) del Reglamento de Organización y Funciones del Hospital "Hermilio Valdizán", aprobado por R.M. N° 797-2003-SA/DM; y, contando con la visación de la Dirección Adjunta de la Dirección General y Oficina de Asesoría Jurídica del Hospital;

### SE RESUELVE:

**Artículo 1°.-** Aprobar el Documento denominado "Manual de Procedimientos de Inmunología 2015, del Hospital Hermilio Valdizán"; el cual consta de cincuenta y uno (51) páginas, que en documento adjunto forma parte integrante de la presente Resolución.

**Artículo 2°.-** El Departamento de Apoyo al Diagnóstico es el responsable de la difusión e implementación del referido Plan, el mismo que informará periódicamente a la Dirección General sobre el desarrollo y resultados obtenidos.

**Artículo 3°.-** Disponer a la Oficina de Estadística e Informática, la publicación de la presente Resolución conjuntamente con el referido Documento, en el portal Web del Hospital.

Regístrese y Comuníquese,

Patricia R.  
Distribución:  
SDG  
EPIDEMIOLOGIA  
INFORMATICA  
OAJ  
OCI  
FILE RESOLUCIONES XVI-2015

MINISTERIO DE SALUD  
HOSPITAL HERMILIO VALDIZAN  
Dra. *Amelia Arias Albino*  
Directora General (e)  
C.M.P.12667-RNE 4326

MINI-  
HOSPITAL HERMILIO VALDIZAN  
OFICINA DE ESTADÍSTICA  
E INFORMÁTICA  
11 ENE. 2016  
RECEPCION  
Hora.....Firma.



MANUAL DE  
PROCEDIMIENTOS  
INMUNOLOGIA  
SERVICIO  
LABORATORIO CLINICO  
HOSPITAL HERMILIO  
VALDIZAN  
2015

# INDICE

Introducción .....	03
Finalidad .....	04
Objetivo .....	05
Base Legal .....	06
Ámbito de Aplicación .....	07
Contenido .....	08
Conceptos importante .....	08
1. Factor Reumatoide .....	10
2. Antígenos Febriles : Tífico "O", Tífico "H", Paratífico "A", Paratífico "B" y Brucella Abortus .....	12
3. PCR (Proteína C reactiva) .....	14
4. Prueba de Embarazo (hCG cualitativa) .....	16
5. RPR (Prueba No-treponémica para la detección serológica de Sífilis.....	18
6. Detección de HIV Virus de inmunodeficiencia Humana (Método de ELISA)	
7. HIV (Prueba rápida) .....	26
8. T4 Libre (Hormona tiroxina)- Método ELISA .....	32
9. T3 Libre (Hormona triyodotironina)- Método ELISA.....	35
10. TSH (Hormona Estimulante de Tiroides) Método ELISA.....	38
11. Metabolito Cocaína en orina .....	43
12. Metabolito Marihuana (THC) en orina .....	46
Responsabilidades .....	49
Anexos .....	50
Bibliografía .....	51

## INTRODUCCION

La inmunología tiene como objetivo el estudio de los fenómenos relacionados con la inmunidad, por inmunidad se entiende el conjunto de mecanismos de defensa que protegen contra los microagresores encontrados en el medio ambiente. Inmunología, palabra de origen latino, etimológicamente significa, privilegio, exención. Su estudio se amplía a considerar las diversas reacciones que utiliza el organismo para mantener su integridad. Se llama reacción inmunitaria a la reactividad nueva y específica que el organismo adquiere después de la introducción de un antígeno infeccioso, molécula, etc. Es importante generar la conciencia de trabajar con calidad, para que el médico siempre tenga confianza en el laboratorio y apoyarse en él, con la certeza que se le apoyará y que éste pueda otorgar al paciente un diagnóstico cercano o definitivo.

En este contexto, el Servicio de Laboratorio del Hospital Hermilio Valdizán está elaborando un Manual de Procedimiento Inmunológicos, cuyo objetivo es exponer de manera clara las prácticas implementadas en esta área, desarrollar habilidades y aptitudes necesarias para el manejo adecuado de muestras biológicas, realizar técnicas y métodos inmunológicos que apoyarán en el diagnóstico certero y oportuno de padecimiento inmunes aplicado a los pacientes de salud mental y que cursen con interurrencias médicas.

Cada una de las pruebas de laboratorio expuestas presentan una breve introducción como significado clínico, fundamentos teóricos de cada técnica, descripción general de los procedimientos, algunas notas sobre los principales cuidados e interpretación de la prueba.

Finalmente, este manual está sujeto a modificaciones y otros aportes que los colaboradores puedan hacernos llegar para mejorarlo en beneficio de todos los trabajadores y usuarios del Hospital Hermilio Valdizán.

## **FINALIDAD**

Este manual tiene como finalidad uniformizar los procedimientos de diagnóstico serológico de las principales enfermedades inmunológicas estandarizadas en el servicio de laboratorio del Hospital Hermilio Valdizán, esperando que pueda convertirse en una herramienta útil para la capacitación del personal que integra esta institución.

## **OBJETIVO**

Este manual de inmunología constituye una herramienta que permitirá orientar el personal sobre las técnicas y procedimientos adecuados que permitan garantizar la confiabilidad de los resultados, uniformizando los criterios para su interpretación y validación.

1.- Difundir los procedimientos técnicos estandarizados para las pruebas de inmunoserología y uniformizar criterios para la interpretación y validación de resultados.

2.- Establecer los procedimientos y criterios para el control de calidad interno en las pruebas de inmunoserología.

3.- Servir como documento de consulta en los procesos y procedimientos de inmunoserología y control de calidad.

## **BASE LEGAL**

1. Ley No. 26842, Ley General de Salud.
2. Decreto Legislativo No. 1161, crea la Ley de Organización y Funciones del Ministerio de Salud.
3. Decreto Legislativo No. 1167, crea el Instituto de Gestión de Servicios de Salud- IGSS.
4. Resolución Ministerial No. 526 – 2011/ MINSA, aprueba “Normas par la elaboración de Documentos Normativos del Ministerio de Salud.



## ÁMBITO DE APLICACIÓN

El presente manual es de aplicación en el laboratorio del Hospital Hermilio Valdizán, el mismo que cuenta con personal calificado, instalaciones, equipos y materiales idóneos para llevar a cabo el diagnóstico serológico de las enfermedades inmunológicas a partir de muestras de pacientes hospitalizados , de emergencia y de consultorio externo.

## **CONTENIDO :**

### **CONCEPTOS IMPORTANTES**

1. **ABSORBANCIA.** Propiedad de una molécula o conjunto de ellas por retener parte de las longitudes de onda de un espectro de luz, no permitiendo su pasaje.
2. **ANALISIS.** En la práctica laboratorial, la realización técnica de un proceso, básicamente la determinación de algún compuesto.
3. **AGLUTININA.** Término aplicado a determinadas sustancias específicas, (anticuerpos), contenidas en algunos sueros, y que son capaces de provocar aglutinación, de ciertas bacterias, glóbulos rojos (hemaglutinina), por estímulo de los aglutinógenos presentes en estos elementos.
4. **ANALITO.** Elemento capaz de ser analizado o determinado.
5. **ANTICUERPO.** Globulinas séricas particulares que tienen la propiedad de combinarse de una manera específica con ciertas sustancias extrañas solubles o celulares, que les corresponden y son denominadas antígenos.
6. **ANTIANTICUERPO.** Anticuerpo capaz de ejercer su acción sobre las proteínas plasmáticas (por ejemplo, aglutinándolas) y por consiguiente sobre los anticuerpos.
7. **EPÍTOPO .** Estructura de un antígeno (fragmento de un antígeno) que es reconocido por un receptor antigénico (anticuerpo o receptor sobre la superficie de la célula T).
8. **CORRIDA.** Término utilizado en la práctica laboratorial, la cual denota el proceso por el cual se determinan concentraciones de un analito en un mismo tiempo o en serie.
9. **CROMÓGENO.** Sustancia o componente químico capaz de virar hacia una tonalidad de color dentro de una reacción química.
10. **ENZIMA.** Proteína que cataliza una reacción química.
11. **INMUNOSEROLÓGICO.** Procedimiento que permite estudiar la presencia de anticuerpos en el suero sanguíneo.

12. KIT . Denominación de un set o contenedor de diversos productos reactivos y materiales necesarios para un análisis.
13. MÉTODO. Proceso o conjunto de procesos que permiten realizar una actividad, en este caso un análisis. Las técnicas son variaciones para poner en la práctica un método.
14. PRESERVACIÓN. Resguardo de las condiciones originales de los componentes químicos en una solución.
15. METODO DE ELISA . (*enzyme linked immunosorbent assay*- ensayo inmunoabsorbente conjugado a enzimas). Ensayo serológico en que la unión del antígeno o del anticuerpo se detecta porque éstos se hallan conjugados a una enzima que, al actuar sobre un sustrato incoloro, da origen a una reacción coloreada. Este ensayo es ampliamente utilizado en biología y medicina, así como en inmunología.
16. REPRODUCIBILIDAD. Capacidad de verificar una misma concentración bajo el mismo método de análisis, pero con analista distinto y en un momento diferente de la determinación original.
17. REPETITIBILIDAD. Capacidad de mantener la determinación de una concentración analítica bajo las mismas condiciones de analista, equipo y momento.
18. STANDARD. Solución o sustancia pura de concentración conocida.
19. SUERO CONTROL. Solución de analitos que se utiliza en el control de Precisión. La concentración obedece a una media y a un rango de valores calificados a ambos lados de esta media.

## FACTOR REUMATOIDE

### *Significado Clínico*

La mayoría de los sueros de pacientes afectados de Artritis Reumatoide tienen la propiedad de reaccionar con la inmunoglobulina G no sólo humana sino también de otras especies. Ello es debido a la presencia en los mismos de un grupo de anticuerpos estrechamente relacionados que se conoce como "factor reumatoide". Esta reacción es del tipo antígeno -anticuerpo, actuando el factor reumatoide en la misma como un anticuerpo.

### *Procedimiento*

El procedimiento serológico para la detección del factor reumatoide consiste en poner en presencia del suero del enfermo partículas sensibilizadas con gammaglobulina, ya sea humana o de otra especie, observándose la aparición o la ausencia de aglutinación. Para este efecto pueden utilizarse distintos tipos de partículas como hematíes, látex, carbón e incluso bacterias, siendo los hematíes los que presentan mayor especificidad.

### *Principio*

El reactivo de Factor Reumatoide (AR) es una suspensión de hematíes de cordero estabilizados y sensibilizados con gammaglobulina de conejo que reaccionará con el factor reumatoide presente en el suero.

Cuando se mezcla el reactivo del Factor Reumatoide (AR) con el suero no diluido, si éste contiene más de 5 UI/ml de factor reumatoide se producirá una clara aglutinación. El enfrentar una dilución 1:10 del suero con el reactivo permitirá una mas amplia interpretación de los resultados. De esta forma si la reacción del suero no diluido con el reactivo es positiva y por el contrario la del suero diluido 1:10 es negativa, podemos interpretar que se trata de un título bajo de factor reumatoide, propio también de una serie de enfermedades ajenas a la artritis reumatoide como el lupus eritematoso, endocarditis, tuberculosis, sífilis, enfermedades víricas, etc.

Los resultados se expresan en UI/ml de factor reumatoide de acuerdo con la Preparación Internacional de Referencia de Suero de Artritis Reumatoide (OMS).

## TEST CUALITATIVO

1. Dejar que los reactivos alcancen la temperatura ambiente.

2. Dosificar 50  $\mu$ l de suero (o una gota de control) en una de las secciones del portaobjetos.
3. Agitar el vial del reactivo y añadir una gota de reactivo junto a la gota de suero.
4. Mezclar ambas gotas con un palillo cubriendo toda la superficie de la sección del portaobjetos.
5. Agitar el portaobjetos con un suave movimiento de rotación, ya sea manualmente o en un agitador rotatorio (60-80 rpm) durante 2 minutos.
6. Observar la presencia o ausencia de aglutinación.
7. Si se observa aglutinación, diluir el suero 1:10 en solución salina y repetir la prueba.

### ***Interpretación de los resultados***

#### **Reacciones positivas :**

La presencia de aglutinación indica un contenido de factor reumatoide en el suero no diluido o superior a 5UI/ml. Si se observa aglutinación, diluir el suero 1:10 en solución salina y repetir la prueba. Si el suero diluido 1:10 también presenta aglutinación podemos pensar en un título elevado de factor reumatoide.

### **TEST CUANTITATIVO**

Preparación de diluciones dobles seriadas del suero en solución salina, desde 1:10 hasta 1:1280:

1. Preparar 8 tubos de ensayo y rotularlos convenientemente.
2. Dosificar 0.9 ml de solución salina en el tubo 1 y 0.5 ml en los tubos 2 al 8.
3. Añadir 0.1 ml de suero al tubo 1 y con ayuda de la misma pipeta, mezclar y transferir 0.5 ml de la mezcla al tubo 2.
4. Mezclar el contenido del tubo 2 y transferir 0.5 ml de la mezcla al tubo 3 y así sucesivamente hasta el tubo 8.
5. Comprobar cada dilución.

### ***Interpretación de los resultados***

Título de factor reumatoide de un suero es la dilución más alta que aún presente aglutinación claramente visible.

## **ANTIGENOS FEBRILES**

### **TIFICO "O", TIFICO "H", PARATIFICO "A", PARATIFICO "B" y BRUCELLA ABORTUS**

#### ***Significado Clínico***

Los reactivos de Antígenos Febriles (antígeno de aglutinación bacteriana), son una suspensión bacteriana para usar en pruebas de aglutinación, en lámina o tubo, para investigar la presencia de bacterias (infección bacteriana ) o exposición previa al organismo relacionado.

Se recomiendan dos procedimientos: la prueba de aglutinación rápida en lámina, procedimiento de tamizaje, se usa para establecer la presencia o ausencia de anticuerpos homólogos y la prueba de aglutinación en tubo la cual se usa para establecer el título del anticuerpo.

#### ***Principio***

El principio de la prueba es una reacción inmunológica entre los anticuerpos (aglutininas) y las bacterias atenuadas presentes en el reactivo.

#### ***Procedimiento***

##### **Materiales requeridos**

- Antígenos febriles "O", "H", "A", "B".
- Lámina de vidrio transparente o con lámina portaobjeto.
- Lápiz de cera.
- Pipetas
- Aplicadores
- Tubos de prueba
- Solución de Cloruro de Sodio : NaCl 0.9%
- Rotador (opcional)
- Reloj
- Llevar todos los reactivos a temperatura ambiente antes de su uso.

### PRUEBA RAPIDA EN LÁMINA

1. En una lámina de vidrio transparente y clara, dividirla en cuadrados de 1 ½ pulgada con un lápiz de cera. Una pequeña ventana panel puede ser usada para este propósito. El uso de láminas portaobjeto también es recomendado.
2. Dispensar las siguientes cantidades de suero: 0.08 ml, 0.04 ml, 0.02 m., 0.01 ml, 0.005 ml.
3. Agitar el antígeno para asegurar una suspensión uniforme y añadir una gota de suspensión de antígeno justo debajo de cada cantidad de suero.
4. Mezclar el suero y el antígeno usando los aplicadores. Usar aplicadores por separado para cada cantidad de suero. Cada mezcla debe formar un área de aproximadamente ¼ de pulgada por 1 pulgada.
5. Rotar la lámina manualmente o en un rotador a 150 r.p.m. por 2 – 3 minutos.
6. Observar la aglutinación usando una buena fuente de luz.
7. Un suero positivo de título conocido y un suero negativo debe ser incluido en los controles.

A pesar que la prueba en lámina no es recomendada para establecer el título, la cantidad de suero dando 50% de aglutinación puede ser usada para establecer el título aproximado del suero.

## PCR (PROTEINA C-REACTIVA)

### *Significado Clínico*

La Proteína C-reactiva es una proteína de fase aguda, presente en el suero de pacientes sanos, la cual puede incrementarse significativamente en la mayoría de procesos infecciosos bacterianos y virales, tejidos dañados, inflamación y neoplasias malignas. El incremento de concentración de esta proteína se produce después de unas horas de desarrollarse la inflamación pudiendo alcanzar niveles de 300 mg/L en 12 – 24 horas.

### *Principio del Método*

La PCR-Látex es una técnica de aglutinación en porta para la detección cualitativa y semicuantitativa de PCR en suero humano. Las partículas de látex recubiertas con anticuerpos anti-PCR humana son aglutinadas por moléculas de PCR presentes en la muestra del paciente.

### *Muestras*

Suero fresco. Estable 8 días a 2 - 8° C o 3 meses a -20° C.  
Las muestras con restos de fibrina deben ser centrifugadas antes de la prueba.  
No utilizar muestras altamente hemolizadas o lipémicas.

### *Procedimiento*

#### Método cualitativo

1. Colocar los reactivos y las muestras a temperatura ambiente. La sensibilidad del ensayo disminuye a temperaturas bajas.
2. Depositar 50 uL de la muestra a ensayar y una gota de cada uno de los controles Positivo y Negativo, sobre círculos distintos de un porta.
3. Homogeneizar suavemente el reactivo de PCR – látex antes de usar. Depositar una gota (50uL) junto a cada una de las gotas anteriores.
4. Mezclar las gotas con un palillo, procurando extender la mezcla por toda la superficie interior del círculo. Emplear palillos distintos para cada muestra.
5. Situar el porta sobre un agitador rotatorio a 80 – 100 r.p.m. y agitar durante 2 minutos. El exceso de tiempo puede originar la aparición de falsos positivos.



### Método semicuantitativo

1. Realizar diluciones dobles de la muestra en solución salina 9 g/L.
2. Proceder para cada dilución , como en la prueba cualitativa.

### **Lectura e interpretación de resultados**

Examinar microscópicamente la presencia o ausencia de aglutinación inmediatamente después de retirar el porta del agitador. La presencia de aglutinación indica una concentración de PCR igual o superior a 6 mg/L.

En el método semicuantitativo, se define el título como la dilución mayor que da resultado positivo.

### **Valores de Referencia y Cálculos**

Hasta 6 mg/L.

La concentración aproximada de PCR en la muestra del paciente se obtiene aplicando la siguiente fórmula :

$$6 \times \text{Título de PCR} = \text{mg/L}$$

### **Consideraciones**

1. Una concentración muy elevada de PCR en la muestra del paciente puede dar lugar a un resultado falsamente negativo debido al efecto prozona (efecto que produce falsos negativos). Se recomienda re-ensayar la muestra utilizando un volumen de 20 uL.
2. La intensidad de la aglutinación no es indicativa de la concentración de PCR en las muestras ensayadas.
3. El diagnóstico clínico no debe realizarse únicamente con los resultados de un único ensayo, sino que debe considerarse al mismo tiempo los datos clínicos del paciente.

## PRUEBA DE EMBARAZO (hCG CUALITATIVA)

### *Significado Clínico*

La Gonadotropina Coriónica humana (hCG) es una hormona glucoproteica producida por la placenta en desarrollo poco después de la fertilización. En el embarazo humano, la hCG puede detectarse tanto en orina como en suero ya a los 7 – 10 días de la concepción.

Los niveles de hCG continúan aumentando muy rápidamente, superando las 100 mUI/ml tras la primera falta y alcanzando el máximo en torno a 100.000 – 200.000 mUI/ml a las 10 – 12 semanas de embarazo. La aparición de hCG en orina y suero poco después de la concepción y su posterior aumento rápido durante el principio de la gestación convierten a esta hormona en un excelente marcador para la detección precoz del embarazo.

### *Principio del método*

La prueba Ultra hCG de Embarazo en un solo paso en Tira (orina/suero), es una prueba rápida que detecta cualitativamente la presencia de hCG en una muestra de orina o suero con una sensibilidad de 10 mUI/ml.

La prueba utiliza una combinación de anticuerpos monoclonales y policlonales para detectar selectivamente los niveles elevados de hCG en orina o suero.

### *Obtención y Preparación de muestras.*

#### Valoración en Orina

Se debe tomar una muestra de orina en un envase limpio y seco. Se prefiere la primera muestra de orina de la mañana, ya que contiene generalmente la concentración mas alta de hCG; sin embargo, se pueden usar muestras de orina recogidas en cualquier momento del día. Las muestras de orina que presenten precipitados visibles se deberán centrifugar, filtrar o dejar posar para obtener una muestra transparente para la realización de la prueba.

#### Valoración en Suero

La sangre se extraerá asépticamente en un tubo limpio sin anticoagulantes. Separar el suero de la sangre en cuanto sea posible, para evitar la hemólisis. Siempre que sea posible, usar muestras transparentes no bemozadas.

### ***Procedimiento***

1. Dejar que la tira, la muestra de orina o suero y/o los controles alcancen la temperatura ambiente (15-30° C) antes de realizar la prueba.
2. Dejar estabilizar la bolsa o envase a temperatura ambiente antes de abrirla. Extraer la tira de la bolsa sellada o el envase cerrado y usarla en cuanto sea posible.
3. Importante : Para el embalaje del envase, cerrar inmediatamente el envase después de extraer el número necesario de tiras. Registrar la fecha de apertura inicial del envase. En cuanto se ha abierto el envase, las tiras sobrantes quedan estables durante 90 días solamente.
4. Con las flechas señalando hacia la muestra de orina o suero, sumergir la tira verticalmente en la muestra de orina o suero al menos durante 10 - 15 segundos. No sumergir por encima de la línea máxima (MAX) de la tira.
5. Colocar la tira en una superficie plana no absorbente, poner en marcha el cronómetro y esperar hasta que aparezcan una o dos líneas coloreadas.
6. Leer el resultado a los 3 minutos cuando se analiza la muestra de orina o a los 5 minutos cuando se analiza la muestra de suero.
7. Una concentración baja de hCG podría dar lugar , después de un período de tiempo prolongado, a la aparición de una débil línea en la región de la prueba (T); por lo tanto, no interpretar el resultado después de 10 minutos.

### ***Interpretación de los resultados***

**POSITIVO:** Aparecen dos líneas coloreadas distintas. Una línea quedará en la región de control (C) y otra línea quedará en la región de la prueba (T).

La intensidad del color de la línea de la región de la prueba (T) puede variar dependiendo de la concentración de hCG presente en la muestra. Por lo tanto, cualquier coloración, por muy débil que sea ésta, en la línea de la región de la prueba (T) deberá considerarse positiva.

**NEGATIVO:** Una línea coloreada aparece en la región de control (C ). No aparece ninguna línea coloreada en la región de la prueba (T).

## **RPR (PRUEBA NO-TREPONEMICA PARA LA DETECCION SEROLÓGICA DE SIFILIS)**

### ***Significado Clínico***

La sífilis es una enfermedad venérea causada por el *Treponema pallidum*, que invade las mucosas intactas o la piel en áreas de abrasiones. El contacto sexual es la forma más común de transmisión.

La detección y tratamiento de la enfermedad en sus estadios tempranos es fundamental a fin de evitar complicaciones graves como sífilis cardiovascular, neurosífilis y sífilis congénita. El diagnóstico de esta enfermedad sufre la carencia de un método para cultivar el microorganismo en medios de laboratorio y la dificultad para detectarlo en estadios de la enfermedad en los que no se observan lesiones epidérmicas. Sin embargo, desde el comienzo de la infección aparecen en el suero del individuo infectado ciertas sustancias denominadas "reaginas" que reaccionan con antígenos de cardiolipina, lecitina y colesterol. Estas reaginas junto a los signos clínicos son por lo tanto los procedimientos más rápidos y útiles disponibles para diagnóstico de sífilis.

### ***Principio del método***

En la prueba rápida para reaginas plasmáticas (RPR), las "reaginas" presentes en el suero de individuos infectados con *Treponema pallidum*, se detectan por acción de las mismas con antígeno de cardiolipina, lecitina y colesterol adsorbido sobre partículas de carbón.

La reacción produce una aglutinación visible macroscópicamente, favorecida por las partículas de carbón.

Las reacciones inespecíficas se evitan con el empleo de antígeno altamente purificado y el agregado de cloruro de colina, por lo que no es necesario inactivar la muestra.

### ***Obtención y Preparación de la muestra***

#### **Suero o plasma**

- a) Recolección : obtener la muestra de la manera usual
- b) Aditivos: en caso de obtener plasma, utilizar heparina, EDTA, fluoruro u oxalato de sodio como anticoagulantes.
- c) Sustancias interferentes conocidas: hemólisis o hiperlipemia pueden provocar resultados erróneos, así como el exceso de anticoagulante empleado en la obtención de plasma.
- d) Estabilidad e instrucciones de almacenamiento: si no se procesa en el momento, el suero puede conservarse hasta 7 días en refrigerador (2 - 10°C). El plasma debe emplearse antes de las 24 horas de efectuada la extracción.

## ***Procedimiento***

### **I.- Prueba Cualitativa**

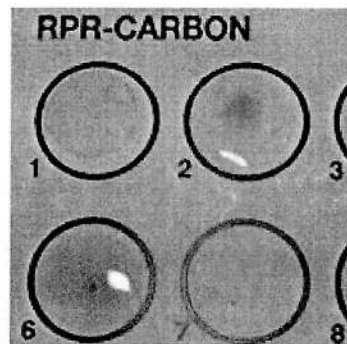
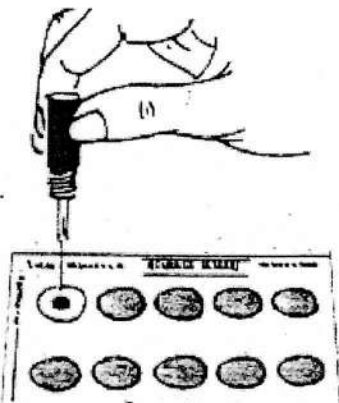
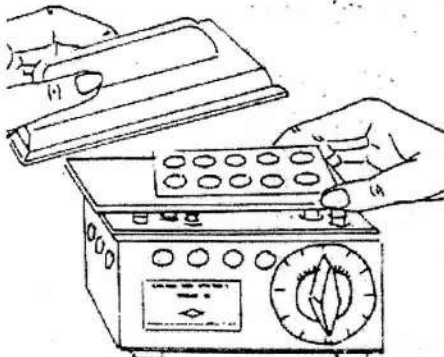
Llevar a temperatura ambiente los reactivos y la muestra antes de realizar el ensayo. En cada uno de los círculos de la tarjeta de reacción colocar con un gotero plástico provisto: Muestra o controles : 1 gota (50ul).

Con el extremo cerrado del gotero distribuir la muestra uniformemente en todo el círculo.

Con el gotero metálico provisto, en posición vertical, agregar en el centro del círculo: reactivo A 1 gota (17ul).

Sin mezclar, hacer rotar horizontalmente la tarjeta de reacción en forma manual o con agitador rotativo a 100 rpm durante 8 minutos. Observar la presencia o ausencia de aglutinación al cabo de este tiempo. Tiempos de lectura mayores pueden dar lugar a falsos resultados.

#### **Anexo 01 : Prueba cualitativa - RPR.**



## **II.- Prueba Semicuantitativa**

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

### ***Interpretación de los resultados***

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

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

### ***Método de control de calidad***

Para controlar la calidad del sistema procesar un Control Positivo y un Control Negativo utilizándolos de la misma forma que la muestra.

## DETECCIÓN DE HIV- VIRUS DE INMUNODEFICIENCIA HUMANA (METODO DE ELISA)

### *Significado Clínico*

El virus de inmunodeficiencia humana tipo 1 y tipo 2 son agentes etiológicos del síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA), complejo relacionado al SIDA y de individuos clínicamente saludables en alto riesgo de SIDA. La infección con VIH es seguida por una enfermedad similar a una gripe aguda. En esta fase puede no notarse y la relación con la infección del VIH puede no ser clara en muchos casos. La fase aguda es típicamente seguida de un estado de portador asintomático, que progresa a un SIDA clínico en cerca del 50% de los individuos infectados dentro de los 10 años después de la seroconversión.

La evidencia serológica de la infección con HIV puede ser obtenida mediante pruebas para presencia de antígenos o anticuerpos del HIV en suero o individuos sospechosos con la infección del HIV. Los antígenos generalmente solo pueden ser detectados durante ambas fases : la aguda y la asintomática de SIDA. Los anticuerpos para HIV-1 y/o HIV-2 pueden ser detectados virtualmente a través del período de infección total, empezando prontamente luego de la fase aguda y durando hasta el estado final del SIDA. Por ello el uso de un ensayo de anticuerpo altamente sensitivo es el primer acercamiento en la serodiagnos de la infección del VIH. A parte de la transmisión sexual, la ruta principal de la infección con el HIV es la transfusión de sangre. El HIV puede estar presente tanto en la fracción celular o fracción celular-libre de la sangre humana. Por ello todas las donaciones de sangre o plasma deben ser probadas por el riesgo de transmisión de VIH a través de sangre contaminada. Esto puede ser logrado efectivamente mediante pruebas para anticuerpos a HIV-1 y HIV-2 empleando pruebas de ELISA altamente sensibles.

### *Principio de la prueba*

El ELISA VIH 1+2 Screening es un inmunoensayo enzimático en "sándwich" doble antígeno de dos pasos de incubación, el cual emplea tiras de micropozos de poli estireno pre-revestido con antígenos recombinantes de HIV expresados en E. coli (HIV recombinante-gp41, gp120 y HIV-2 gp36). Se adicionan muestras de suero o plasma del paciente y durante la primera incubación los anticuerpos específicos HIV 1 - 2 , si están presentes, son capturados dentro de los pozos.

Los micropozos luego se lavan para remover las proteínas de suero no unidas. Un segundo conjunto de antígeno recombinante conjugado con peroxidasa de rábano picante (Conjugado HRP expresando los mismos epítopes como los antígenos precubiertos adicionados, y durante la segunda incubación, estos se unen a los anticuerpos capturados. Los micropozos luego son lavados para remover los conjugados HRP no unidos y son adicionados soluciones de cromógeno en los pozos. En los pozos que contengan el inmunocomplejo "sándwich" antígenos-anticuerpo - antígeno (HRP), los cromógenos sin color son hidrolizados mediante la unión del conjugado HRP a un producto de color azul. El color azul se torna amarillo luego de

parar la reacción con ácido sulfúrico. La cantidad de la intensidad del color puede medirse y es proporcional a la cantidad de los anticuerpos capturados en los pozos, y para la cantidad de anticuerpos en la muestra respectivamente. Los pozos que contengan muestras negativas para HIV 1+2 permanecen incoloros.

### ***Instrucciones especiales para el lavado***

- Un procedimiento de buen lavado es esencial a fin de obtener un dato analítico correcto y preciso.
- Por ello es recomendable usar un buen lavador de microplacas de ELISA, ubicado en el mejor nivel de funcionamiento de lavado. En general, no menos de 5 ciclos de lavado automático de 350 – 400 ul/pozo son suficientes para evitar reacciones falsos positivos y un alto background.
- Para evitar la contaminación cruzada de la placa con muestra o conjugado-HRP, luego de la incubación no descartar el contenido de los pozos, dejar que el lavador de microplacas lo aspire automáticamente.
- De todas maneras, se recomienda calibrar el sistema de lavado en el propio kit a fin de hacer corresponder los comportamientos analíticos declarados. Asegurar que los canales de dispensación de líquidos del lavador de microplacas no se encuentren bloqueados o contaminados y cada vez que se dispense el buffer de lavado en los pozos el volumen sea lo suficientemente correcto.
- En caso de un lavado manual, se sugiere realizar 5 ciclos, dispensando 350-400 ul/pozo y aspirar el líquido por 5 veces. Si se observan resultados pobres (alto background), incrementar los ciclos de lavado o el remojo en cada pozo.
- En cualquier caso los líquidos aspirados de las tiras deben ser tratados con una solución de hipoclorito de sodio a una concentración final de 2.5% por 24 horas, antes de desechar los líquidos adecuadamente.
- La solución de lavado concentrado debe ser diluido de 1 a 20 antes de su uso. Por cada placa mezclar 50 ml del concentrado con 950 ml de agua para un volumen final de 1000 ml de buffer de lavado diluido. Si se emplea menos de una placa, preparar la solución en un volumen proporcional.

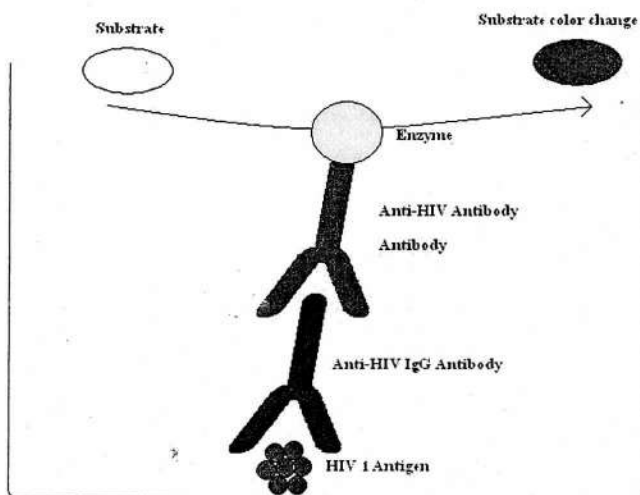
### ***Anexo 02 : Procedimiento del Método ELISA para HIV***

ETAPA	PROCEDIMIENTO	PRECAUCIONES /OBSERVACIONES
Buffer de lavado	Preparación de la solución de lavado	Disolución de los crisales de sales
Diluyente de muestra	Agregar 100 ul de Diluyente de Muestra en cada pocillo	
Muestras	Agregar 100 ul de Muestra, Control Negativo y Control Positivo.	En estufa
Lavado	Lavar cada pocillo con 350 ul de buffer de lavado (5 veces)	Tiempo de contacto de la solución de lavado entre 30 y 60 segundos. Eliminar completamente el líquido residual de los pocillos.

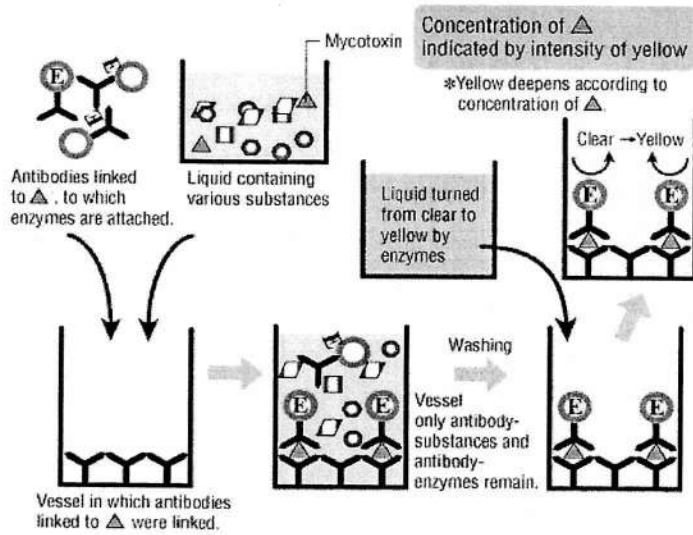


Conjugado 1	Agregar 200 ul de Conjugado 1	
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar a 37°C durante 30 minutos.	En estufa
Preparación	Conjugado 2	Durante la incubación con el Conjugado 1, preparar Conjugado 2
Conjugado 2	Eliminar el Conjugado 1 y dispensar 200 ul de Conjugado 2	No lavar entre el Conjugado 1 y el Conjugado 2 diluido
Incubación	Cubrir los pocillos e incubar a 37°C durante 30 minutos	
Preparación	Revelador	Durante la incubación con el Conjugado 2, preparar el Revelador
Lavado	Similar al lavado anterior	
Revelado	Agregar 200 ul de Revelador	
Incubación	Entre 18 – 25°C durante 30 minutos	Mantener la policubeta protegida de la luz
Detención	Agregar 50 ul de Stopper (solución de pare)	
Lectura	Leer en espectrofotómetro	Leer entre los 5 y 30 minutos.

Anexo 03 : Unión de los sustratos- Método ELISA



Anexo 04 : Principio del método ELISA  
Principle of Enzyme-Linked Immunosolvent Assay (ELISZA)



**Crterios de validación de la corrida**

La prueba se considera válida si se cumplen simultáneamente las siguientes condiciones:

1.- Las lecturas de al menos 2 de los 3 controles negativos deben ser menores o iguales a 0,100 D.O. Si un control negativo no cumple con el criterio se debe excluir.

Ejemplo : cálculo del promedio de los controles negativos

Control	Absorbancia (resultado de lectura en Equipo Lector ELISAS)
1	0,019
2	0,016
3	<u>0,016</u>
Total	0,051

$$CN = \text{Total Abs} / 3 = 0,051 / 3 = 0,017$$

2.- Las lecturas de los Controles Positivos debe ser mayor o igual a 0,800 D.O.

Ejemplo : lectura de los Controles positivos

Control	Absorbancia
1	1,968
2	2,012

3.- La lectura del Control positivo para p24 debe ser mayor o igual a 0.400 D.O.

Nota : si uno o mas criterios de los enunciados arriba no cumplen, repetir la corrida.

**Cut-off (Punto de corte / Valor mínimo de confianza)**

Calcular el valor del Cut-off sumando 0,180 al promedio de los controles negativos

Ejemplo : promedio Controles Negativos = 0,017

Valor Cut-off =  $0,180 + 0,017 = 0,197$

### ***Interpretación de los resultados***

***Muestras no reactivas*** : se consideran aquellas cuyo valor de absorbancia es menor al valor Cut – off.

***Muestras inicialmente reactivas*** : se consideran aquellas cuyo valor de absorbancia es mayor o igual al valor Cut-off. Estas muestras deben ser reanalizadas por duplicado usando la muestra original.

Si los duplicados son negativos, la muestra se considera no reactiva para HIV.

Si por lo menos uno de los duplicados es positivo, la muestra se considera repetidamente reactiva y contiene antígeno p24 y/o anticuerpos contra HIV-1 o HIV-2

Los resultados repetidamente reactivos deben corroborarse por un método confirmatorio, de acuerdo a la normativa legal vigente. Una muestra inicialmente reactiva puede ser no reactiva en las dos repeticiones. Esto puede deberse a:

- Contaminación cruzada de un pocillo no reactivo por una muestra con título elevado de anticuerpos anti HIV y/o antígeno.
- Contaminación de la muestra durante la dispensación, imprecisión en el dispensado de la muestra y/o de los conjugados o TMB en el pocillo, reutilización de los tips o punteras.
- Contaminación del pocillo con hipoclorito u otros agentes oxidantes.
- Muestras no coaguladas completamente, con restos de fibrina o fibronectina.

### **Anexo 05 : Interpretación de los resultados**



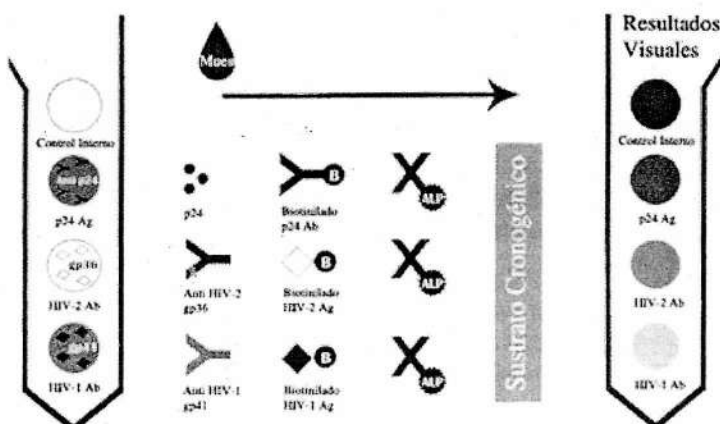
## HIV (PRUEBA RAPIDA)

### Indicaciones

El ensayo de HIV 1 / 2 prueba rápida (tiras o casetes) es una prueba inmunocromatográfica de cribado de un solo uso que emplea un cóctel de antígenos para detectar la presencia de anticuerpos anti VIH 1 y 2 en suero, plasma o sangre completa. Los resultados reactivos son indicios de exposición al VIH1/2 y pueden utilizarse para apoyar un diagnóstico clínico de VIH 1 o VIH 2. Los resultados no reactivos, sin embargo, no deben utilizarse para excluir la infección por VIH 1 o 2.

### Principio de la prueba

Utiliza una combinación de proteínas de unión a anticuerpos conjugadas con partículas de colorante de oro coloidal y antígenos del VIH 1 / 2 unidos a la fase sólida de la membrana. La muestra que se va a analizar y el tampón de procesamiento se aplican en la almohadilla de muestra. El tampón de procesamiento facilita el flujo lateral de la muestra a través de la membrana y favorece la unión de los anticuerpos a los antígenos. Si hay anticuerpos presentes, estos se unen a la proteína de unión a anticuerpos conjugada con oro. En una muestra reactiva, el complejo inmune conjugado con el colorante migra a la membrana de nitrocelulosa, donde es capturado por los antígenos inmovilizados en el área de prueba (TEST), generando una línea de color rosa/morado. Si no hay anticuerpos anti -VIH 1 / 2 presentes, no se forma una línea rosa/morada en el área de prueba. La muestra sigue migrando a lo largo de la membrana y genera una línea de color rosa/morado en el área de CONTROL, que contiene antígenos de inmunoglobulina G. Este control del procedimiento permite demostrar que las muestras y los reactivos se han aplicado y han migrado correctamente a través del dispositivo.

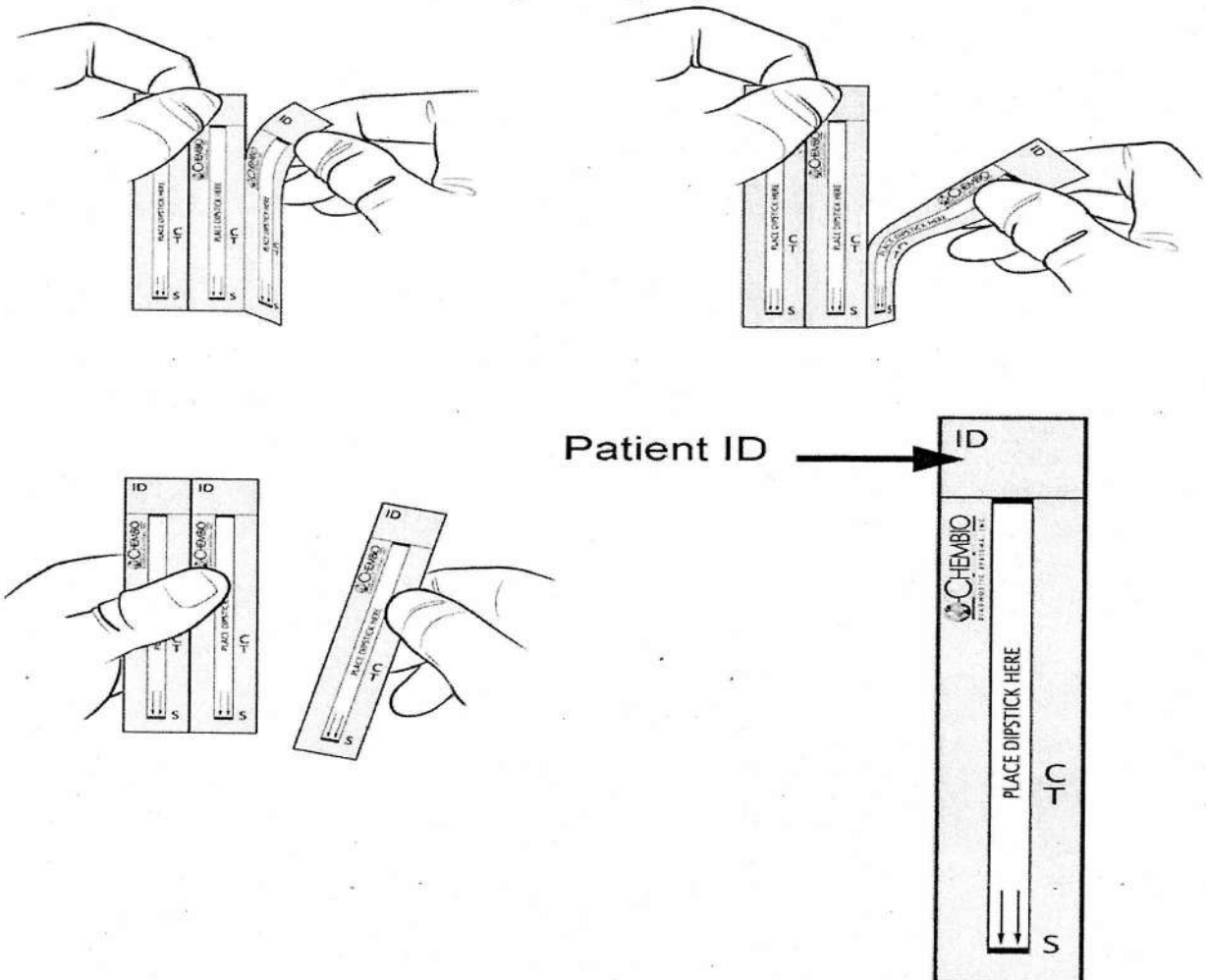


### Procedimiento

Si la muestra que se desea analizar está refrigerada, extraerla de la nevera y esperar a que alcance la temperatura ambiente antes de realizar la prueba.

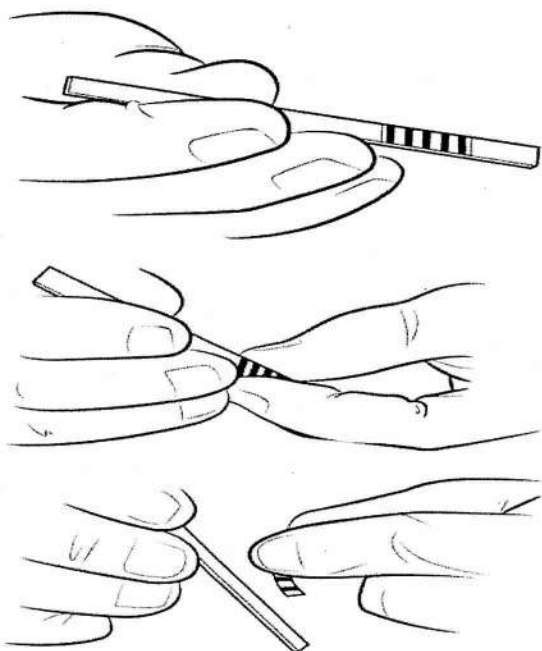
1.- Retirar las tarjetas de soporte y desprender un segmento para cada prueba que se vaya a realizar. Anotar la identificación del paciente o de la muestra en el espacio marcado como "ID" en la tarjeta.

### Anexo 06 : Procedimiento del Método prueba rápida para HIV



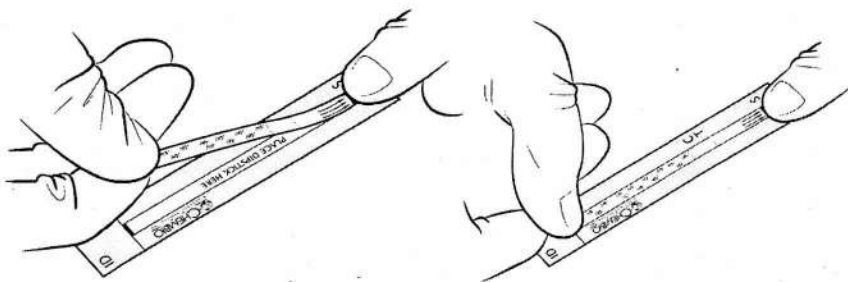
2.- Extraer una tira reactiva para VIH 1 / 2 del vial. El vial con las tiras reactivas solo debe abrirse para extraer las tiras necesarias para la prueba y debe cerrarse herméticamente de inmediato.

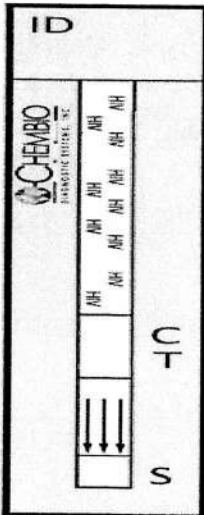
3.- Con cuidado de no tocar la membrana, girar la tira reactiva de forma que la cinta verde quede hacia fuera y retirar el protector rojo de las tiras adhesivas en la parte posterior de la tira reactiva. Desechar el protector rojo.



Back of Dipstick

4.- Colocar la tira reactiva en el espacio marcado de la tarjeta de soporte, con la cinta verde hacia arriba y las flechas de la cinta apuntando en la misma dirección que las flechas de la tarjeta de soporte. Colocar la tarjeta de soporte con la tira reactiva sobre una superficie limpia y plana.





### 5.- Recogida de muestra

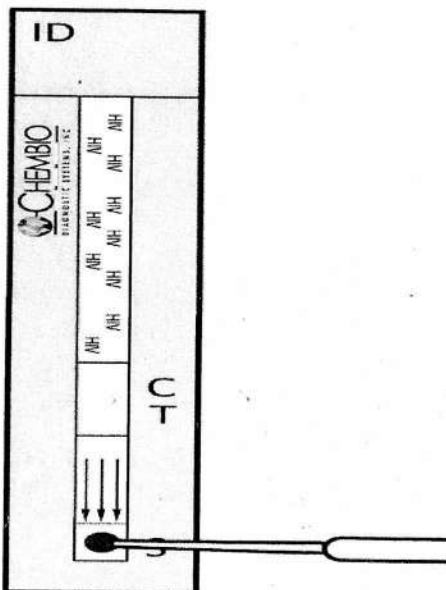
#### **A. Sangre completa de punción dactilar**

- Seguir el procedimiento del laboratorio para pinchar el dedo con una lanceta y limpiar la primera gota de sangre.
- Recoger la muestra de la segunda gota, tocándola con el asa para muestras de 5 ul suministrada. Continuar con el paso 6.

#### **B. Suero, plasma o sangre completa venosa**

Tocar la muestra con el asa para muestras de 5 ul suministrada hasta llenar la abertura circular del asa con la muestra.

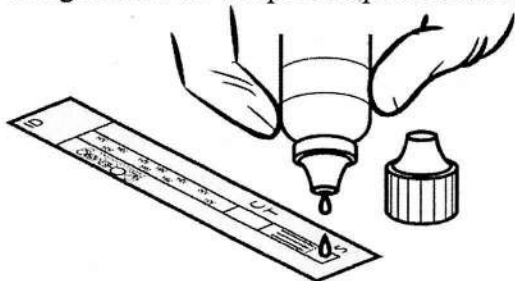
6.- Sostener el asa para muestras en posición vertical y tocar con ella la almohadilla de muestras que hay en el centro del área de muestra (S) de la tira reactiva para dispensar 5 ul de muestra (suero, plasma o sangre completa) en la almohadilla de muestras.



7.- Invertir el frasco de tampón de procesamiento y sostenerlo en posición vertical (sin inclinación) sobre el área de muestra.

Añadir lentamente 3 gotas (105 ul) de tampón, una a una, al área de muestra (S), asegurándose de que la almohadilla de muestras absorba cada gota antes de añadir la siguiente.

NOTA: Si el líquido no empieza a fluir por la membrana al cabo de 2 minutos, añadir una gota más de tampón de procesamiento.



8.- Leer el resultado de la prueba entre 15 y 20 minutos después de añadir el tampón de procesamiento. En algunos casos puede aparecer una línea de prueba en menos de 15 minutos, sin embargo, hacen falta 15 minutos para notificar un resultado no reactivo. Leer los resultados en un lugar bien iluminado.

No leer los resultados después de 20 minutos.

NOTA: Desechar el asa para muestras usada, la tira reactiva, la tarjeta de soporte y los guantes en un recipiente para residuos bio-peligrosos.

## **CONTROL DE CALIDAD**

- Si la prueba se ha realizado correctamente y el dispositivo funciona adecuadamente, siempre deberá aparecer una línea de color rosa/morado en el área de CONTROL. Esta línea sirve como control interno del procedimiento.
- Las buenas prácticas de laboratorio (BPL) recomiendan el uso de materiales de control junto con las muestras para confirmar el funcionamiento correcto del kit de pruebas. Para ello deben utilizarse controles comerciales de suero o plasma reactivos y no reactivos. Tener en cuenta que algunos controles comerciales diseñados para el método ELISA no funcionarán correctamente con el ensayo de Tiras reactivas.

### ***Interpretación de los Resultados***

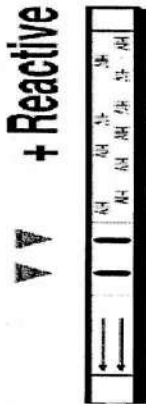
#### **Resultado reactivo**

Una línea de color rosa/morado, una en el área de prueba (TEST) y otra en el área de CONTROL, indican un resultado reactivo. La línea del área de prueba puede tener un aspecto distinto de la del área de CONTROL. La intensidad de la línea del área de



prueba varía en función de la concentración de anticuerpos específicos de apenas visible a un color muy oscuro.

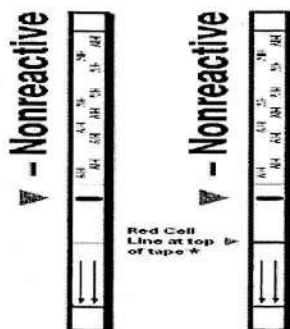
NOTA : una línea en el área de prueba, aunque sea muy tenue, debe considerarse reactiva. Se recomienda confirmar los resultados reactivos por Western Blot o IFA(ensayo Inmunofluorescente) de acuerdo con las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS).



### Resultado no reactivo

Una línea de color rosa/morado en el área de CONTROL sin ninguna línea de color en el área de prueba indica un resultado no reactivo. Un resultado no reactivo al cabo de 15 minutos indica que la muestra del paciente no contiene anticuerpos anti-VIH, pero no excluye la infección por VIH.

En raras ocasiones puede aparecer una línea de hematíes con las muestras de sangre; esta línea no afecta a los resultados de la prueba y no debe interpretarse como un resultado positivo de la prueba.



### Resultados no válidos

Siempre debe aparecer una línea de color rosa/morado en el área de CONTROL, independientemente de si aparece la línea de prueba o no. Si no aparece una línea rosa/morada claramente visible en el área de CONTROL, la prueba no es válida. Se recomienda repetir la prueba con un dispositivo nuevo.

## **T4 LIBRE (HORMONA TIROXINA) METODO ELISA**

### ***Significado Clínico***

Tiroxina, la hormona tiroidea principal, circula en la sangre casi completamente atada acarreado proteínas. El sostén principal es la globulina tiroxina-atada (TBG). De cualquier manera, solo la porción libre (desatada) de tiroxina es responsable de la acción biológica. Más adelante, las concentraciones de las proteínas de sostén están alteradas en condiciones clínicas variables, tales como el embarazo. En funciones tiroideas normales como las concentraciones de las proteínas alteradas, acarreadas, el nivel de tiroxina total cambia para que las concentraciones de tiroxina libre se mantengan constantes. Así las mediciones de concentraciones de tiroxina libre correlacionan mejor con el status clínico que los niveles de tiroxina total.

El incremento de tiroxina total asociada con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógenos ocasionalmente resultan en niveles de T4 total sobre los límites de lo normal del rango de referencia. Enmascarando la función tiroidea anormal puede ocurrir también tanto en condiciones de hiper o hipotiroidismo por alteraciones en la concentración de TBG. El t4 total puede elevarse o disminuir por los cambios de TBG tales como el resultado de los niveles normales de referencia. La concentración de tiroxina libre puede ayudar a descubrir el status clínico actual del paciente.

### ***Principio del método***

Immunoanálisis Competitivo de enzima  
Método Análogo para T4 Libre

Los reactivos esenciales requeridos para una fase sólida de enzima en inmunoensayo incluye el anticuerpo inmovilizado, enzima-antígeno conjugado y antígeno nativo. Mezclando el anticuerpo inmovilizado, el conjugado de enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y la conjugación de enzima-antígeno para un número limitado de sitios insolubles atados.

Después de logrado el equilibrio, la fracción anticuerpo-límite es separada del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática, en la fracción del anticuerpo-atado es inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre nativo. Utilizando varias referencias del suero de los valores del antígeno conocido, una curva a la reacción a cierta dosis puede ser generada a través de la cual se comprueba la concentración del antígeno desconocido.

### ***Procedimiento***

Antes de proceder con el análisis, colocar todos los reactivos, referencias del suero y controles a temperatura ambiente (20 – 27°C).

1.- Ajustar el formato de los pozos de las microplacas para que cada referencia del suero, control y muestra del paciente sean corridas por duplicado. Devolver cualquier

tira que no use del micropozo nuevamente a la bolsa de aluminio, sellarla y almacenarla de 2 a 8°C.

2.- Medir con una pipeta 0,050 ml (50ul) de la referencia del control o de la muestra del paciente en el pozo asignado.

3.- Agregar 0.100 ml (100ul) del Reactivo de Enzima de T4 Libre en cada pozo.

4.- Agitar la micro placa suavemente durante 20 a 30 segundos para mezclar y taparla.

5.- Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.

6.- Desechar el contenido de la micro placa por decantación o aspiración. Si se decanta, golpear ligeramente y secar la placa con el papel absorbente.

7.- Agregar 300 ul del buffer lavador, decantarlo contra el papel absorbente. Repetir dos veces para un total de tres lavadas.

8.- Agregar 0.100 ml(100 ul) de solución de señal de trabajo a todos los pozos. Agregar siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.

**NO AGITAR EL PLATO DESPUES DE LA ADICIÓN DEL SUSTRATO**

9.- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

10.- Agregar 0.050 (50 ul) de solución de paro en cada pozo y mezclar gentilmente por 15 a 20 segundos.

11.- Leer la absorbancia en cada pocillo a 450 nm, con el equipo Lector de ELISAS.

### ***Parámetros del control de calidad***

Para que los resultados del análisis sean considerados válidos deben tenerse en cuenta los siguientes criterios:

- La absorbancia del calibrador 0 ng/dl debe ser  $\geq 1.3$
- Cuatro fuera de seis POOL del control de calidad deben estar dentro de los rangos.

### ***Interpretación***

- 1) Los resultados de laboratorio por sí solos no determinan únicamente la conducta hacia el paciente y no deben basarse para una terapia definitiva.
- 2) Los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos establecidos para obtener resultados válidos.
- 3) Es importante que los valores prestablecidos para los calibradores caigan dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
- 4) La concentración de Tiroxina Libre depende de múltiples factores: la función de la glándula tiroides y su regulación, la concentración de la Globulina atada a la

- tiroxina (TBG) y el atado de la Tiroxina a la TBG. Así la concentración de Tiroxina Libre aislada no es suficiente par comprobar un status clínico.
- 5) Los valores de Tiroxina libre en suero pueden elevarse bajo condiciones tales como el embarazo o la administración de anticonceptivos orales.
  - 6) Valores bajos de Tiroxina Libre en suero se encuentran en enfermedades de pérdida de proteínas, hepáticas, administración de testosterona, difenildantoina o salicilatos, etc.
  - 7) Su interpretación se complica por una variedad de drogas que pueden afectar la unión de la T4 al sostén de proteínas de la hormona Tiroidea o interferir en su metabolismo con la T3. En infecciones serias, el diagnóstico de tiroides puede resultar difícil. Puede existir hipotiroidismo primario concomitante o secundario compensatorio. En estos casos se recomienda el dosaje de TSH ultrasensible.
  - 8) La Heparina interfiere con los niveles in vitro e in vivo sobre la T4 libre. Las muestras de pacientes con terapia de heparina deben ser recolectadas antes de la administración del anticoagulante.

**Anexo 07 : Valores esperados para la T4 Libre (en ng/dl)**

	Adultos	Embarazos
	(89 muestras)	(31 muestras)
Significado (x)	1.40	1.50
Desviación Standard	0.30	0.37
Rangos esperados +/- 2DE	0.8 – 2.0	0.76 – 2.24

## **T3 LIBRE HORMONA (METODO ELISA)**

### ***Significado Clínico***

Triiodotironina, una hormona tiroidea, circula en la sangre ligada a las proteínas acarreadas. El transporte principal de la proteína es la tiroxina-ligada globulina (TBG). El sostén principal es la globulina tiroxina-atada (TBG). De cualquier manera, solo la porción libre (desatada) de tiroxina es responsable de la acción biológica. Más adelante, las concentraciones de las proteínas de sostén están alteradas en condiciones clínicas variables, tales como el embarazo. En funciones tiroideas normales como las concentraciones de las proteínas alteradas, acarreadas, el nivel de tiroxina total cambia para que las concentraciones de tiroxina libre se mantengan constantes. Así las mediciones de concentraciones de tiroxina libre correlacionan mejor con el status clínico que los niveles de tiroxina total.

El incremento en niveles de triiodotironina total asociada con el embarazo, anticonceptivos orales y terapia de estrógenos resulta en niveles mayores de T3 total, mientras que las concentraciones de T3 libre permanecen básicamente sin cambio.

### ***Principio del método***

Inmunoanálisis Competitivo de enzima  
Método Análogo para T3 Libre

Los reactivos esenciales requeridos para una fase sólida de enzima en inmunoensayo incluye el anticuerpo inmovilizado, enzima-antígeno conjugado y antígeno nativo. Mezclando el anticuerpo inmovilizado, el conjugado de enzima-antígeno y un suero que contiene el antígeno nativo, una reacción de la competición resulta entre el antígeno nativo y la conjugación de enzima-antígeno para un número limitado de sitios insolubles atados.

Después de logrado el equilibrio, la fracción anticuerpo-límite es separada del antígeno desatado por la decantación o la aspiración. La actividad enzimática, en la fracción del anticuerpo-atado es inversamente proporcional a la concentración del antígeno libre nativo. Utilizando varias referencias del suero de los valores del antígeno conocido, una curva a la reacción a cierta dosis puede ser generada a través de la cual se comprueba la concentración del antígeno desconocido.

### ***Procedimiento***

Antes de proceder con el análisis, colocar todos los reactivos, referencias del suero y controles a temperatura ambiente (20 – 27°C).

1.- Ajustar el formato de los pozos de las microplacas para que cada referencia del suero, control y muestra del paciente sean corridas por duplicado. Devolver cualquier tira que no use del micropozo nuevamente a la bolsa de aluminio, sellarle y almacenarla de 2 a 8°C.

2.- Medir con una pipeta 0,050 ml (50ul) de la referencia del control o de la muestra del paciente en el pozo asignado.

- 3.- Agregar 0.100 ml (100ul) del Reactivo de Enzima de T4 Libre en cada pozo.
  - 4.- Agitar la micro placa suavemente durante 20 a 30 segundos para mezclar y taparla.
  - 5.- Incubar 60 minutos a temperatura ambiente.
  - 6.- Desechar el contenido de la micro placa por decantación o aspiración. Si se decanta, golpear ligeramente y secar la placa con el papel absorbente.
  - 7.- Agregar 300 ul del buffer lavador, decantarlo contra el papel absorbente. Repetir dos veces para un total de tres lavadas.
  - 8.- Agregar 0.100 ml (100ul) de solución activadora del sustrato a todos los pozos. Agregar siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias del tiempo de reacción entre los pozos.
- NO AGITAR EL PLATO DESPUES DE LA ADICIÓN DEL SUSTRATO**
- 9.- Incubar a temperatura ambiente por 15 minutos.
  - 10.- Agregar 0.050 ml (50ul) de la solución de paro a cada pozo y mezclar suavemente por 15 – 20 segundos.
  - 11.- Leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm (con una referencia de longitud de onda de 620 – 630 nm para reducir al mínimo imperfecciones del pozo) en un equipo lector de microplacas. Leer los resultados en un plazo de treinta (30) minutos de agregada la solución de pare.

### ***Parámetros del control de calidad***

Para que los resultados del análisis sean considerados válidos debe tenerse en cuenta los siguientes criterios:

- La absorbancia (OD) del calibrador F debe ser  $> 0 = 1.3$
- Cuatro fuera de seis POOL del control de calidad deben estar dentro de los rangos establecidos.

### ***Interpretación***

- 1) Los resultados de laboratorio por sí solos no son el único aspecto para determinar el cuidado del paciente y no deben basarse para una terapia, particularmente si el resultado crea interferencias con otras determinantes.
- 2) Los controles adecuados y otros parámetros deben estar dentro de los rangos establecidos para obtener resultados válidos.
- 3) Es importante que los valores prestablecidos para los calibradores caigan dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
- 4) Si la muestra de un paciente da lecturas mas altas que el calibrador ( $> 16\text{pg/ml}$ ), no hay que diluir la muestra. Las variaciones de TBC en diferentes muestras no permiten que la hormona T3 Libre se diluye.

- 5) Existen muchas drogas que afectan la unión de Triiodotironina a la hormona tiroidea que acarrea la proteína o su metabolismo a la T3 y complica la interpretación de resultados de T3 libre.
- 6) También pueden interferir los anticuerpos circulantes de T3 e inhibidores de la hormona.
- 7) No se debe obtener muestras en pacientes tratados con anti-coagulantes, debe ser antes la toma de muestra.
- 8) Pueden dar resultados erróneos sobre los análisis de T3 Libre algunas condiciones familiares como disalbuminemias.

**Anexo 08 : Valores esperados para la T3 Libre (en pg/ml)**

	Adultos (110 muestras)	Embarazos (75 muestras)
Significado (x)	2.8	3.0
Desviación Standard	0.7	0.6
Rangos esperados +/- 2DE	1.4 – 4.2	1.8 – 4.2

## TSH (HORMONA ESTIMULANTE DE TIROIDES) METODO ELISA

### *Significado clínico*

La tirotrópina (TSH) es una glicoproteína con un peso molecular de 28,000 daltons y secretada por la porción anterior de la glándula pituitaria, es considerada como un indicador sensible de diagnóstico primario y secundario de hipotiroidismo. El incremento de concentraciones de TSH en el suero, el cual es primariamente responsable de la síntesis y liberación de hormonas tiroideas, es un indicador temprano y sensible del decremento de las reservas tiroideas y en unión con el decremento de concentraciones de tiroxina (T4) es diagnóstico de hipotiroidismo primario. El incremento esperado de concentraciones de TSH demuestra el sistema de retroalimentación negativo clásico entre la glándula pituitaria y la glándula tiroidea. Esto es, cuando falla la glándula tiroidea primaria se reduce la secreción de las hormonas tiroideas, las cuales alternadamente estimulan la liberación de TSH de la pituitaria.

Adicionalmente, las medidas de la concentración de TSH son igualmente utilizadas en la diferenciación del hipotiroidismo secundario y terciario (hipotalámico) del hipotiroidismo primario. La secreción de TSH de la pituitaria está regulada por el factor de producción de tirotrópina (TRH), el cual es secretado por el hipotálamo, y por acción directa de T4 y de la triiodotironina (T3). El incremento en los niveles de T3 y T4 reduce la respuesta de la secreción de la glándula pituitaria a los efectos estimulantes de TRH. En el hipotiroidismo secundario y terciario, las concentraciones de T4 son usualmente bajas y los niveles de TSH son generalmente bajos o normales. Esto es causado tanto por la deficiencia de TSH en la glándula pituitaria (hipotiroidismo secundario) como por la insuficiencia en la estimulación de la glándula pituitaria por la TRH (hipotiroidismo terciario). Las pruebas de estimulación de TRH hacen la diferencia entre estas dos condiciones. En el hipotiroidismo secundario, la TSH responde al TRH saturado, mientras que en el *hipotiroidismo terciario se encuentra normal o ligeramente bajo*.

### *Principio del método*

Los reactivos esenciales requeridos por un análisis inmunoenzimométrico incluyen alta afinidad y especificidad de anticuerpos (enzima conjugada e inmovilizada), con diferentes epitopes reconocidas y antígeno nativo. En este procedimiento, la inmovilización toma lugar durante el análisis en la superficie del micro pozo a través de la interacción de la estreptavidina recubierto en el pozo y el anticuerpo anti-TSH monoclonal biotinilado. Después de mezclar el anticuerpo monoclonal inmovilizado, el conjugado de la enzima-antígeno y el suero que contiene el antígeno nativo, nos da por resultado una reacción de competencia entre el antígeno nativo y los anticuerpos que no compiten para formar un complejo soluble (sándwich).

Simultáneamente, el complejo es depositado en el pocillo a través de la reacción de alta afinidad de estreptavidina y el anticuerpo biotinilado.

Después de que se obtiene el equilibrio, la fracción del anticuerpo unido es separado del antígeno a través de la decantación. La actividad enzimática en la fracción del anticuerpo es directamente proporcional a la concentración nativa del antígeno.



Se genera una curva de la reacción utilizando diversos calibradores con valores conocidos del antígeno, en el cual se puede comprobar la concentración de una muestra desconocida.

### ***Reactivos***

#### **Material proveído**

a.- Calibradores Tirotropina – 1ml/vial – Frascos A – G

Siete (7) frascos de referencia del suero para el antígeno TSH en los niveles 0(A), 0.5 (B), 2.5 (C), 5.0 (D), 10(E), 20 (F) y 40(G) uIU/ml. , cuya temperatura de almacenamiento es de 2 a 8°C.

b.- Reactivo de Enzima TSH – 13 ml/frasco

Un frasco etiquetado con la enzima anticuerpo purificado de cabra policlonal, biotinilado monoclonal de ratón IgG en solución, tinte y preservante. Temperatura de almacenamiento 2 a 8 °C.

c.- Microplaca de 96 pozos revestida con Estreptavidina

Una microplaca de 96 pozos cubierto con Estreptavidina y empaquetado dentro de una bolsa de aluminio con un agente deshidratado. Temperatura de almacenamiento : de 2 a 8 °C.

d.- Solución de lavado concentrada 20 ml

Un frasco que contiene un surfactante en solución salina.

e.- Sustrato A – de 7 ml/frasco

Es una solución de tetrametilbenzidina (TMB).

e.- Sustrato B – de 7 ml/frasco

Contiene peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en solución.

f.- Solución de pare – de 8 ml

Solución que contiene ácido clorhídrico.

#### **Otros materiales requeridos**

- Pipetas de 50 ul y 100ul con precisión mayor a 1.5%.
- Dispensadores o punteras para volúmenes de 0.100ml y 0.300 ml con una precisión mayor de 1.5%.
- Equipo Lavador de micro placas
- Equipo Lector de micro placas con filtros de 450 nm y 620 nm
- Papel absorbente para secar el micro plato de pozos.
- Plástico envolvente o tapa para la micro placa en sus respectivos pasos de incubación.
- Cronómetro
- Contenedor para guardar la solución de lavado.
- Agua destilada o des ionizada.

### ***Obtención y preparación de la muestra***

Las muestras pueden ser sangre, suero teniendo las precauciones generales en la recolección de la muestra a través de la venopuntura. Se debe obtener una muestra en condiciones de ayuno para la comparación exacta con los valores normales establecidos. Recolectar la sangre en un tubo al vacío de tapa roja, sin aditivo o con gel separador. Dejar que la sangre coagule. Centrifugar la muestra para permitir la separación del suero con las células.

Las muestras se pueden refrigerar a 2 – 8 °C por un período máximo de cinco días. Si la muestra no se puede analizar dentro de este periodo, se puede almacenar en la congeladora a temperatura de -20°C, hasta por 30 días. Evitar congelar y descongelar. Se requiere la cantidad de 0.100 ml de muestra cuando se va a analizar por duplicado.

### ***Procedimiento de la prueba***

Antes de proceder con el análisis, colocar todos los reactivos, calibradores y controles a temperatura ambiente.

1.- Utilizar los pocillos necesarios de las micro placas para correr los calibradores, controles y muestras problemas por duplicado. Guardar los micro pozos nuevamente dentro de la bolsa de aluminio, sellarla y almacenarla a temperatura de 2 a 8 °C.

2.- Dispensar con una pipeta 0.050ml (50ul) de los calibradores, sueros control y muestras problema a los pocillos asignados para el análisis.

3.- Agregar 0.100 ml (100ul) de la solución del reactivo de la enzima TSH. Es muy importante dispensar todos los reactivos cerca del fondo del pozo.

4.- Agitar la micro placa suavemente por 20 a 30 segundos para mezclar y cubrir.

5.- Incubar durante 60 minutos a temperatura ambiente.

6.- Desechar el contenido de la micro placa por decantación. Al decantar, golpear ligeramente y secar la placa con papel absorbente.

7.- Agregar 300 ul de la solución de lavado, decantarlo. Repetir dos veces adicionales para completar un total de tres lavadas. Utilizar un equipo lavador de ELISAS automático o manual.

8.- Agregar 0.100 ml (10ul) de solución activadora del sustrato a todos los pozos. Agregar siempre los reactivos en el mismo orden para reducir al mínimo diferencias de tiempo de reacción entre los pozos.

**NO AGITAR DESPUES DE ADICIONAR EL SUSTRATO**

9.- Incubar a temperatura ambiente durante 15 minutos.

10.- Agregar 0.050 ml (50ul) de la solución de parada a cada pozo y mezclar suavemente durante 15 a 20 segundos.

11.- Leer la absorbancia de cada pozo a 450 nm (con una longitud de onda de referencia de 620 – 630nm para reducir al mínimo las imperfecciones del pozo) en un equipo LECTOR DE MICRO PLACAS POR ELISAS. Los resultados se deben leer en el plazo de treinta (30) minutos de agregada la solución de parada.

### ***Control de calidad***

Para un monitoreo óptimo del buen funcionamiento de la prueba, el laboratorio cuenta con controles de ensayo en valores cuyos rangos son bajo, medio y alto, con referencia a la curva de reacción.

Los controles deben ser tratados como muestras desconocidas y determinarse los valores en cada método de prueba realizada. Las tablas de control de Calidad deben de mantenerse para seguir el funcionamiento de los reactivos proveídos. Deben emplearse los métodos estadísticos pertinentes para comprobar las tendencias.

Desviaciones significativas en el funcionamiento establecido pueden indicar un cambio experimental en las condiciones o degradación del kit de reactivos. Deben emplearse reactivos nuevos para determinar la razón de las variaciones.

### ***Cálculo de los resultados***

Se utiliza una curva de reacción para comparar la concentración de tirotropina en muestras desconocidas.

- 1) Registrar la absorbancia obtenida del listado del lector de micro placas.
- 2) Trazar la absorbancia para cada referencia duplicada del suero contra la concentración correspondiente de TSH en uIU/ml en el papel gráfico lineal.(No promediar los duplicados de referencias del suero antes de trazar).
- 3) Dibujar la mejor curva a través de los puntos trazados.
- 4) Para determinar la concentración del TSH para una muestra desconocida, localizar la absorbancia media de los duplicados par cada desconocido en el eje del gráfico, encontrar el punto que se intersecta en la curva, y leer la concentración (en uIU/ml) del eje del gráfico (se puede obtener un promedio de los duplicados de las muestras desconocidas). En el siguiente ejemplo, el promedio de absorbancia (0.775) intersecta la curva de reacción en (7.66uIU/ml) la concentración de TSH.

Anexo 09 : Valores de absorbancia según cocentración de hormona TSH

TSH ( uIU/ml)	Absorbancia (450 nm)
0	0.063
0.5	0.157
2	0.398
5	0.818
10	1.415
25	2.645

### ***Interpretación de los resultados***

- 1) Los resultados de laboratorio por si solos son un aspecto para determinar el cuidado del paciente y no debe ser un determinante para proporcionar terapia, si los resultados crean conflicto con otras determinantes.
- 2) Para validar los resultados de las pruebas, se debe adecuar controles y otros parámetros dentro de los rangos establecidos.
- 3) Se espera que los valores prestablecidos para los calibradores varíen dentro del 10% de las concentraciones asignadas.
- 4) Las concentraciones de TSH en suero son independientes de diversos factores : función de la glándula hipotalámica, glándula tiroides y la TRH en la pituitaria.
- 5) Los valores de TSH pueden ser elevados por intervención farmacológica , domperidona, amiodazona, yodo, fenobarbital y fenitoina.
- 6) Un decremento en sus valores se ha reportado con la administración de propranolol, metamizol, dopamina y tiroxina.
- 7) Las variantes genéticas o degradación de la TSH en sub-unidades pueden afectar las características de los anticuerpos e influir en el resultado final. Así como las muestras normalmente dan diferentes resultados entre varios sistemas de análisis debido a la reactividad de los anticuerpos involucrados. La interpretación de T4 Libre es compleja por una variedad de interferencia con drogas que pueden afectar la división de T4 o interferir en el metabolismo de la T3.

### ***Valores esperados para el sistema de prueba por ELISA***

- Rango Bajo Normal : 0.39 uIU/ml
- Rango Alto Normal : 6.16 uIU/ml

## METABOLITO COCAINA EN ORINA

### *Significado clínico*

Derivado de hojas de la planta de coca, la cocaína es un potente estimulante del sistema nervioso central y un anestésico local. La cocaína se excreta en la orina principalmente como benzoilecgonina en un corto período de tiempo. Benzoilecgonina tiene una vida biológica media de 5 a 8 horas, lo cual es mucho más largo que el de cocaína (0.5 a 1.5 horas), y puede ser detectado por lo general entre 24 y 60 horas después del uso de la cocaína o la exposición. La cocaína se usa principalmente como una droga estimulante del SNC. La cocaína es a menudo auto-administrada por inhalación nasal, inyección intravenosa y base libre para fumar.

Si bien la confirmación de técnicas distintas a la GC/MS pueden ser suficientes para algunas drogas de abuso, la GC/MS es generalmente aceptada como una vigorosa técnica de confirmación para todas las drogas, ya que proporciona el mejor nivel de confianza en el resultado.

La prueba de cocaína en cassette en orina es fácil de realizar sin necesidad de instrumentación adicional. El sistema de prueba única emplea anticuerpos monoclonales y policlonales para identificar selectivamente benzoilecgonina en muestras de orina con un alto grado de sensibilidad. Se obtiene un resultado positivo cuando el metabolito de cocaína en la orina es superior a 300 ng/ml.

### *Principio de la prueba*

Es un inmunoensayo basado en el principio de unión competitiva. Los fármacos que pueden estar presentes en la muestra de orina pueden competir contra las drogas conjugado para sitios de unión en el anticuerpo.

Durante el ensayo, una muestra de orina migra hacia arriba por acción capilar. Si la Benzoilecgonina está presente en la muestra de orina en una concentración inferior a 300 ng/ml, no saturará los sitios de unión de anticuerpos en la tira reactiva. Las partículas recubiertas de anticuerpos será capturado por el conjugado inmobilizado benzoilecgonina y una línea visible de color aparecerá en la región de la línea de ensayo. La línea de color no se forma en la región de línea de prueba si el nivel de la benzoilecgonina está por encima de 300 ng/ml, ya que satura todos los sitios de unión de anticuerpos. Una muestra de orina positiva no generará una línea de color en la prueba de línea región, debido a la competencia de drogas, mientras que una muestra negativa de orina o una muestra que contiene una concentración inferior a la de corte generará una línea en la prueba. Para servir como un procedimiento de control, una línea de color aparecerá siempre en la línea de control región lo que indica que el volumen adecuado de muestra se ha añadido a la membrana y la reacción se ha producido correctamente.

### *Reactivos*

La prueba de cassette contiene anticuerpos monoclonales de ratón anti-benzoilecgonina acoplado con partículas de benzoilecgonina conjugadas en proteínas. Un anticuerpo de cabra se emplea en la línea de control del sistema.

### **Obtención y Preparación de la muestra**

La orina debe recogerse en un recipiente limpio y seco. Pueden utilizarse muestras de orina recogidas en cualquier momento del día. Las muestras que exhiben precipitaciones visibles deben centrifugarse o filtrarse para obtener una muestra adecuada y clara para la prueba.

Las muestras de orina pueden ser almacenadas a 2 – 8 °C durante un máximo de 48 horas antes del ensayo. Para un almacenamiento prolongado, los especímenes pueden ser congelados y almacenados por debajo de -20°C. Los especímenes congelados deben ser descongelados y mezclados antes de la prueba.

### **Procedimiento**

- 1) Abrir el envoltorio de papel de aluminio desgarrando a lo largo de la muesca y eliminar el dispositivo de prueba.
- 2) Colocar el cassette de prueba en un recipiente limpio y a nivel de la superficie. Sostener el gotero verticalmente y transferir 3 gotas de orina (aproximadamente 100ul) para la muestra así (S) del cassette de la prueba y luego iniciar el temporizador. Evitar la captura de burbujas de aire en la muestra.
- 3) Esperar a que la línea de color (S) que desea aparezca. Leer los resultados en 5 minutos. No interpretar el resultado después de 10 minutos.

Anexo 10 : Procedimiento prueba rápida Metabolito Cocaína



## ***Interpretación de los resultados***

### **Resultado positivo**

Una línea de color es visible en la región de la línea de control ( C ), pero no en la región de la línea de ensayo (T). Un resultado positivo indica que la concentración de benzoilecgonina es igual o superior a la sensibilidad de la prueba (300ng/ml).

### **Resultado negativo**

Dos líneas de color aparecen. Una línea de color debe estar en la región ( C ) de la línea de control, y otra línea de color aparente debe estar en la región de la línea de ensayo. Este resultado negativo indica que la concentración de benzoilecgonina está por debajo del nivel detectable.

NOTA. La sombra de color en la región de línea de prueba (T) puede variar, pero debe considerarse negativo siempre que haya incluso una línea de color tenue.

### **Resultado no válido**

La línea de control no aparece

La insuficiencia de volumen de la muestra o técnicas de procedimiento incorrecto son las causas más probables de fracaso de la línea de control. Se recomienda revisar el procedimiento y repetir la prueba utilizando una nueva prueba.

## ***Control de calidad***

Se incluye un procedimiento de control en la prueba. Una línea de color que aparece en la región de control ( C ) se considera un procedimiento de control interno, lo cual confirma que el volumen de muestra es suficiente, la membrana de nitrocelulosa es adecuada y la técnica de procesamiento es correcta.

## ***Limitaciones***

1. Esta prueba sólo proporciona desde el punto de vista cualitativo, un resultado analítico preliminar. Se debe utilizar un segundo método de análisis para obtener un resultado confirmatorio: GC / MS y LC / MS (Cromatografía de gases – espectrometría de masas), que es el método estándar de oro.
2. Adulterantes como el polvo de blanqueo en muestras de orina pueden producir resultados erróneos independientemente del método analítico utilizado. Si se sospecha adulteración, debe repetirse la prueba con otra muestra de orina.
3. Un resultado positivo indica la presencia de drogas o sus metabolitos, pero no indica el nivel o la intoxicación, vía de administración o la concentración en la muestra de orina.
4. Un resultado negativo puede no indicar necesariamente estar libre de drogas en la orina. Esto puede obtenerse cuando se presenta benzoilecgonina, pero por debajo del valor de corte de la prueba.
5. La prueba no distingue entre las drogas y el abuso de ciertos medicamentos.

## METABOLITO MARIHUANA EN ORINA (THC)

### *Significado Clínico*

El THC es el principal ingrediente activo de los cannabinoides (marihuana). Cuando se fuma o se administra por vía oral, produce efectos eufóricos. Los usuarios tienen problemas de memoria a corto plazo, se reduce el aprendizaje. También pueden experimentar episodios transitorios de confusión y ansiedad. A largo plazo, con el uso relativamente intenso puede estar asociada con trastornos del comportamiento. El efecto pico de fumar marihuana ocurre en 20 – 30 minutos y la duración es de 90 -120 minutos después de un cigarrillo. Se encuentran niveles elevados de metabolitos urinarios dentro de pocas horas de exposición y permanecen detectables por 3 – 10 días después de fumar. El principal metabolito excretado en la orina es EL 11-ni-  $\Delta$  9-tetrahidrocannabinol-9-ácido carboxílico (  $\Delta$  9-THC-COOH).

El procedimiento es fácil, se puede realizar sin el uso de instrumental adicional. La prueba utiliza un anticuerpo monoclonal para detectar selectivamente niveles elevados de Marihuana en orina. Se obtiene un resultado positivo cuando la concentración de Marihuana en la orina supera los 50 ng / ml.

### *Principio del método*

La prueba de Marihuana (THC) en cassette es un inmunoensayo rápido de cromatografía basado en el principio de unión competitiva. Los fármacos que pueden estar presentes en la muestra de orina pueden competir contra las drogas conjugado para sitios de unión en el anticuerpo. Durante el ensayo, una muestra de orina migra hacia arriba por acción capilar. Si los metabolitos de marihuana, están presentes en la muestra de orina por debajo de 50 ng / ml, no se saturan los sitios de unión de las partículas recubiertas de anticuerpos. Las partículas recubiertas de anticuerpos serán capturadas por el conjugado inmovilizado Marihuana y una línea visible de color aparecerá en la región de línea de prueba. La línea de color no se forma en la región de línea de prueba si el nivel del metabolito Marihuana está por encima de 50 ng/ml, ya que saturan todos los sitios de unión en lucha con los anticuerpos contra Marihuana. Una muestra de orina positiva no generará una línea de color en la región de línea de prueba, debido a la competencia de drogas, mientras que una muestra negativa o que contiene una concentración inferior a la del corte generará una línea en la región de la línea de prueba. Una línea de color aparecerá siempre en la región de línea de control (procedimiento de control), lo que indica que el volumen de muestra es adecuado y la reacción en la membrana de nitrocelulosa se ha producido correctamente.

### *Obtención y preparación de la muestra*

La orina debe recogerse en un recipiente limpio y seco. Pueden utilizarse las muestras de orina recogidas en cualquier momento del día. Las muestras que exhiben precipitaciones visibles deben centrifugarse, filtrarse para obtener una clara muestra para la prueba.

Las muestras de orina pueden ser almacenadas a 2 – 8 °C durante un máximo de 48 horas antes del ensayo. Para un almacenamiento prolongado, los especímenes pueden



ser congelados y almacenados por debajo de  $-20^{\circ}\text{C}$ . Los especímenes congelados deben ser descongelados y mezclados antes de la prueba.

### **Procedimiento**

- 1) Retirar la cinta de prueba de la bolsa sellada y usarla lo antes posible.
- 2) Colocar el cassette de prueba en un recipiente limpio y a nivel de la superficie. Sostener el gotero verticalmente y transferir 3 gotas de orina (100 ul) para la muestra (S) de la prueba de cassette y a continuación, iniciar el temporizador. Evitar la formación de burbujas de aire en la muestra(S).
- 3) Esperar a que la línea roja (S) que desea ver, aparezca. El resultado debe leerse a los 5 minutos. No interpretar el resultado después de 10 minutos.

### **Anexo 11 : Procedimiento prueba rápida Metabolito Marihuana (THC)**



### **Interpretación de los resultados**

#### **Resultado positivo**

Una línea de color es visible en la región de la línea de control ( C), pero no en la región de la línea de ensayo (T). Un resultado positivo indica que la concentración de marihuana es igual o superior a la sensibilidad de la prueba (50ng/ml).

#### **Resultado negativo**

Aparecen dos líneas de color. Una línea de color debe estar en la región ( C) de la línea de control, y otra línea de color aparente debe estar en la región de la línea de ensayo. Este resultado negativo indica que la concentración de THC está por debajo del nivel detectable de 50 ng/ml.

NOTA. La sombra de color en la región de línea de prueba (T) puede variar, pero debe considerarse negativo siempre que haya incluso una línea de color tenue.

**Resultado no válido**

La línea de control no aparece.

La insuficiencia de volumen de la muestra o técnicas de procedimiento incorrecto son las causas mas probables de fracaso de la línea de control. Se recomienda revisar el procedimiento y repetir la prueba utilizando una nueva prueba.

***Control de calidad***

Existe un procedimiento de control dentro de la prueba. Una línea de color que aparece en la región de control ( C ) se considera un procedimiento de control interno, lo cual confirma que el volumen de muestra es suficiente, la membrana de nitrocelulosa es adecuada y la técnica de procesamiento es correcta.

## **RESPONSABILIDADES**

En el Hospital Hermilio Valdizán (HHV) , el Servicio de Laboratorio a través de su Dirección Ejecutiva de Administración es responsable de autorizar la elaboración, revisión y actualización del presente manual de acuerdo a los procedimientos estandarizados por las normativas técnicas sustentadas en la Base Legal.

El jefe del Servicio de laboratorio debe asegurar el control de calidad interno, la idoneidad del personal, equipos, materiales, reactivos e instalaciones.

El personal del laboratorio es responsable de planificar las acciones, organizar, controlar y cumplir las disposiciones contenidas en el presente manual.

El personal médico, técnico y operativo son responsables de seguir las especificaciones técnicas contenidas en el presente manual y aplicar los procedimientos específicos indicado.

## ANEXOS

	PAGINA
Anexo No.01 : Prueba cualitativa – RPR	..... 19
Anexo No.02 : Procedimiento del Método ELISA para HIV	..... 22
Anexo No.03 : Esquema de unión de los sustratos	..... 23
Anexo No.04 : Principio del método ELISA	..... 24
Anexo No.05 : Interpretación de los resultados	..... 25
Anexo No.06 : Procedimiento del Método rápido para HIV	..... 27
Anexo No.07 : Valores esperados para la T4 libre (en ng/dl)	..... 34
Anexo No.08 : Valores esperados para la T3 libre (en ng/dl)	..... 37
Anexo No.09 : Valores de absorbancia según concentración de TSH.....	41
Anexo No.10 : Procedimiento de la prueba rápida Cocaína	..... 44
Anexo No.11 : Procedimiento de la prueba rápida Marihuana(THC).....	47

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO. INMUNOLOGIA.  
Universidad Mariano Galvez. Guatemala – 2011.
2. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS PARA EL DIAGNOSTICO  
SEROLÓGICO DE LAS ZONOSIS PARASITARIAS Y OTRAS  
PRUEBAS INMUNOLOGICAS. INS- 2002.
3. MANUAL DE PRACTICAS DE INMUNOLOGIA CLINICA. Universidad  
de Murcia. Profesor Gonzalo Rubio Pedraza.
4. MANUAL OF CLINICAL IMMUNOLOGY LABORATORY. 6<sup>th</sup>. Edition.  
ASM. USA. Rose, N., Hamilton, R.G., Detrick, B. 2002
5. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DEL LABORATORIO CLINICO  
“T.M. Hernán Alcaino Lara”. Hospital San Camilo. Gobierno de  
Chile. 2da. Edición – Noviembre 2011.

