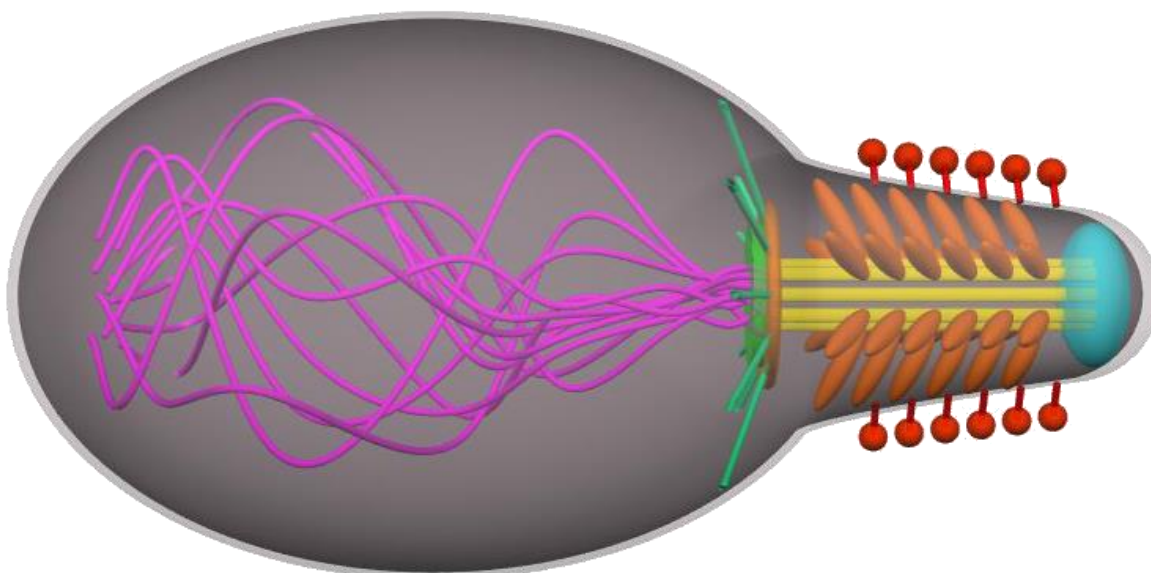


GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFLUORESCENCIA**Guía de Procedimiento de determinación sérica de Anticuerpos IgM de
patógenos atípicos y virus respiratorios por inmunofluorescencia****Servicio de Patología Clínica
Unidad de Soporte al Diagnóstico y Tratamiento**

Elaborado por:	Revisado por:	Aprobado por:
Equipo Técnico del área de Inmunología Especializada del Servicio de Patología Clínica	<ul style="list-style-type: none">• Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento• Unidad de Gestión de la Calidad	Dr. Antonio Ricardo Zopfi Rubio Director (e) del Instituto Nacional de Salud del - Niño San Borja

Marzo 2019	GP-037/INSN-SB/USDXT-PC/V.01	Página 1 de 10
------------	------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFLUORESCENCIA**Guía de Procedimiento de determinación sérica de Anticuerpos IgM
de patógenos atípicos y virus respiratorios por inmunofluorescencia**

I.	Título.....	3
II.	Finalidad	3
III.	Objetivo	3
IV.	Ámbito de aplicación	3
V.	Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT.....	3
VI.	Consideraciones Generales	3
	a. Definiciones Operativas	3
	1. Definición del Procedimiento.....	3
	b. Conceptos Básicos	4
	c. Requerimientos Básicos	4
VII.	Consideraciones Específicas	6
	a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento.....	6
	b. Indicaciones.....	8
	1. Indicaciones Absolutas	8
	c. Riesgos o complicaciones frecuentes.....	8
	d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes.....	8
	e. Contraindicaciones.....	8
VIII.	Recomendaciones	9
IX.	Autores, fecha y lugar.....	9
X.	Anexos	9
XI.	Bibliografía.....	10

Guía de Procedimiento de determinación sérica de Anticuerpos IgM de patógenos atípicos y virus respiratorios por inmunofluorescencia

I. Título

Determinación Cualitativa de virus respiratorios por inmunofluorescencia directa.

II. Finalidad

El manual de Procedimientos operativos estandarizados (POE) tiene por finalidad describir el procedimiento técnico en detalle para la determinación de anticuerpos Ig M de patógenos atípicos y virus respiratorios, lo cual permitirá al personal de laboratorio cumplir con un procedimiento de trabajo estandarizado y requerido en la Norma NTP-ISO 15189:2014.

III. Objetivo

Estandarizar los procedimientos pre-analíticos, analíticos y pos-analíticos de laboratorio en la determinación de anticuerpos Ig M de patógenos atípicos y virus respiratorios en muestras séricas, para la detección de agentes etiológicos de neumonía atípica.

IV. Ámbito de aplicación

El presente manual se aplica en el Área de Inmunología especializada del Servicio de Patología Clínica, Unidad de Soporte al Diagnóstico y tratamiento del Instituto Nacional de Salud del Niño (INSN-SB).

V. Nombre del Proceso o Procedimiento a Estandarizar y Código CPT

Determinación de Ac. Ig M de patógenos atípicos y virus respiratorios (CPT 8834701)

VI. Consideraciones Generales

a. Definiciones Operativas

1. Definición del Procedimiento

La prueba para la determinación de anticuerpos Ig M de patógenos atípicos y virus respiratorios utiliza la técnica de inmunofluorescencia indirecta, en la reacción los anticuerpos de la muestra con el antígeno unido a la superficie del portaobjetos, los anticuerpos específicos presentes en la muestra reaccionan con el antígeno, y las inmunoglobulinas no unidas por reacción con el antígeno son eliminadas en el proceso de lavado. En un paso posterior el complejo antígeno-anticuerpo es revelado mediante globulina antihumana marcada con fluoresceína, resultando visualizable mediante el microscopio de fluorescencia.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFLUORESCENCIA**b. Conceptos Básicos**

- ✓ **Antígeno:** Cualquier sustancia que hace que el cuerpo produzca una respuesta inmunitaria contra ella. Los antígenos incluyen toxinas, sustancias químicas, bacterias, virus u otras sustancias de fuera del cuerpo. Los tejidos y las células corporales, incluso las células cancerosas, también contienen antígenos que pueden producir una respuesta inmunitaria. Estos antígenos también se pueden usar como marcadores en pruebas de laboratorio.
- ✓ **Anticuerpo:** Proteína elaborada por las células en respuesta a un antígeno, cada anticuerpo se puede unir a un solo antígeno específico. El propósito de esta unión es ayudar a destruir el antígeno. Algunos anticuerpos destruyen los antígenos directamente. Otros facilitan la tarea de los glóbulos blancos para destruir el antígeno. Un anticuerpo es un tipo de inmunoglobulina.
- ✓ **Inmunofluorescencia (IF):** técnica que consiste en conjugar colorantes fluorescentes con anticuerpos, exponiendo después este conjugado a los anticuerpos o antígenos correspondientes en cortes de tejidos, frotis de microorganismo o células. Cuando la fluoresceína se conjuga directamente con el anticuerpo primario la técnica es directa y cuando la fluoresceína se conjuga con un anticuerpo secundario la técnica es indirecta.

c. Requerimientos Básicos

- **Equipos Biomédicos**
 - Centrifuga para tubos cónicos
 - Agitador vortex
 - Refrigerador-congelador de laboratorio
 - Cabina de bioseguridad
 - Incubadora de 37°C
 - Microscopio de fluorescencia
- **Material Médico no Fungible**
 - Micropipeta variable, 1 canal, 20-200 ul
 - Micropipeta variable, 1 canal, 1-50 ul
 - Soporte en carrusel para micropipetas
 - Gradilla de tubos
 - Gradilla de microtubos
 - Gafas de protección transparente
 - Probeta graduada de vidrio de 500 ml
 - Timer digital de 1 alarma
 - Piceta de 200 ml (2)
 - Caja coplin de vidrio
 - Frasco de vidrio autoclavable de 1000 ml
 - Cámara húmeda

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFUORESCENCIA➤ **Material Médico Fungible**• **Reactivos**

- Kit de la determinación de ac. IgM patógenos atípicos y virus respiratorios PNEUMOSLIDE IgM, contiene:
 1. Vircell pneumoslides: 10 portaobjetos de 10 pocillos cada uno con los siguientes antígenos:
L. pneumophila, M. pneumoniae, C. burnetii, C. pneumoniae, Adenovirus, VRS, Influenza A, Influenza B, Parainfluenza serotipos 1, 2 y 3 y control de células.
 2. Vircell PBS (polvo).
 3. Control positivo Ig M.
 4. Control negativo Ig M.
 5. Conjugado Anti-FITC solución de globulina anti-Ig M humana marcada con fluoresceína.
 6. Solución de montaje glicerol.
 7. Sorbente suero anti-IgG humana.

• **Materiales**

- Tubo de extracción al vacío
- Aguja de extracción de sangre
- Guantes de nitrilo
- Mascarilla médica desechable
- Gorro desechable
- Papel absorbente
- Campo de trabajo
- Cubreobjetos 22x 60 mm

• **Soluciones**

- Alcohol medicinal 70°.
- Agua desionizada

• **Responsables:**

- Médico Patólogo Clínico.
- Tecnólogo Médico con especialidad en Laboratorio Clínico
- Técnico de laboratorio.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFUORESCENCIA**VII. Consideraciones Específicas****a. Descripción detallada del Proceso o Procedimiento**

Tiempo: 180 minutos

a.1. Indicaciones pre-analíticas

1. La orden médica deberá ser entregada a la recepción del servicio de Patología Clínica, con los datos completos del paciente, sello y firma del médico, sello del SIS (si corresponde) y adjuntando la ficha clínica epidemiológica del paciente. (ver anexo 1).

a.2. Materiales de toma de muestra

1. Tubo de extracción al vacío
2. Aguja de extracción sanguínea
3. Guantes, mascarilla y las gafas de protección.

a.3. Procedimiento de toma de muestra

La obtención de la muestra de sangre será mediante una punción venosa periférica (previa desinfección de la zona), utilizando una aguja de extracción de sangre y un tubo de extracción.

a.4. Transporte y almacenamiento de las muestras

1. Las muestras son entregadas a la recepción del servicio de Patología Clínica.
2. Los tubos con muestras de sangre serán centrifugados a 2500-3000 rpm x 5-10 min. para obtener el suero.
3. Posteriormente las muestras son entregadas al área de Inmunología junto con la orden médica correspondiente.
4. Las muestras pueden conservarse a 2-8°C durante 7 días, para almacenados más prolongados conservar el suero a -20°C.

a.5. Preparación y almacenamiento de los componentes del kit:

1. Los componentes del kit deben ser conservados a 2-8°C en oscuridad y serán llevados a temperatura ambiente (18-25°C) durante al menos 30 min. antes de usarlos. Los reactivos serán estables hasta la fecha de caducidad que aparece en la etiqueta.
2. La preparación de la solución de lavado de trabajo se realizara añadiendo el contenido en polvo del frasco PBS en agua desionizada c.s.p 1000 ml; y conservar a 2-8°C.

Marzo 2019	GP-037/INSN-SB/USDXT-PC/V.01	Página 6 de 10
------------	------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFLUORESCENCIA**a.6. Control de calidad interno**

1. Se utilizarán 2 portaobjetos del kit: uno para el control negativo y otro para el control positivo, usando los controles respectivos; el protocolo de procesamiento será igual que para las muestras.
2. En el portaobjetos del control positivo: se observará fluorescencia verde manzana en la totalidad de las bacterias en los casos de legionella, Chlamydophila o Coxiella; fluorescencia verde manzana en la periferia celular en los casos de Mycoplasma; fluorescencia verde manzana nuclear, citoplasmática y/o periférica en un 1-15% de las células de adenovirus, influenza, VRS o parainfluenza.
3. En el portaobjetos del control negativo: ausencia de fluorescencia para Legionella, Chlamydophila y Coxiella y patrón celular rojo para Mycoplasma, adenovirus, influenza A y B, VRS y parainfluenza.

a.7. Procesamiento de la muestra**Preparación de la Muestra:**

1. Diluir el suero ($\frac{1}{2}$): 30 ul de suero + 30 ul de PBS
2. Añadir en un microtubo 30 ul suero diluido $\frac{1}{2}$ + 150 ul de sorbente IgG (7)
3. Centrifugar el microtubo a 4000 rpm x 15 min.
4. No hacer diluciones a los controles.
5. Al finalizar se obtendrá un sobrenadante de la muestra, con la cual se trabajará.

Proceso de IFI:

1. Sacar el portaobjetos del empaque.
2. Colocar en cada pocillo de un portaobjetos: 15 ul del sobrenadante/control negativo/control positivo según corresponda.
3. Incubar en cámara húmeda a 37°C x 90 min.
4. Inclinar la lámina y lavar con PBS preparado.
5. En un recipiente colocar PBS preparado y sumergir la lámina, rotar a 45 rpm x 10 min.
6. Inclinar la lámina y enjuagar con agua destilada. Secar a T. ambiente.
7. Añadir 15 ul de conjugado anti IgM – FITC en cada pocillo.
8. Incubar en cámara húmeda a 37°C x 30 min.
9. Inclinar la lámina y lavar con PBS preparado.
10. En un recipiente colocar PBS preparado y sumergir la lámina, rotar a 45 rpm x 10 min.
11. Inclinar la lámina y enjuagar con agua destilada. Secar a T.A.
12. Añadir 1 gota de líquido de montaje a cada pocillo.
13. Cubrir con cubreobjetos.
14. Examinar al microscopio de fluorescencia con aumento de 200X y 400X.

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFLOURESCENCIA**a.8. Interpretación de resultados****Resultado Positivo**

Es aquella donde se observa una fluorescencia verde manzana en la totalidad de las bacterias en los casos de legionella, Chlamydomphila o Coxiella; fluorescencia verde manzana en la periferia celular en las muestras positivas a mycoplasma; fluorescencia verde manzana nuclear, citoplasmática y/o periférica en un 1-15% de las células de las células en las muestras positivas a adenovirus, influenza, VRS o parainfluenza. (Ver anexo N°2).

a.9. Informe de resultados

1. Los resultados son ingresados al sistema de registros de pacientes del área de Inmunología, por el Tecnólogo Médico de turno y posteriormente impresos.
2. El Médico Patólogo valida los resultados y los ingresa al sistema hospitalario Galenos (solo los resultados de los pacientes del INSN-SB).
3. Los resultados impresos y validados son entregados al personal técnico del Servicio de Patología para su informe según corresponda la procedencia de la solicitud médica:
 - a. A la oficina de Archivos del INSN-SB: los resultados de las solicitudes procedentes de consultorios del INSN-SB.
 - b. Al servicio de hospitalización: los resultados de las solicitudes procedentes de hospitalización.
 - c. Al archivo del Servicio de Patología: los resultados de las solicitudes externas al INSN-SB.

b. Indicaciones**1. Indicaciones Absolutas**

La prueba está indicada para:

- Todo paciente menor de 2 años internado por IRA en sala común, unidades de cuidados intermedios o intensivos.
- Todo paciente de cualquier edad internado por IRAG en sala de cuidados intensivos.
- Vigilancia epidemiológica.

c. Riesgos o complicaciones frecuentes

Ninguno

d. Riesgos o complicaciones poco frecuentes

Ninguno

e. Contraindicaciones

Ninguna.



Ministerio
de Salud

Instituto Nacional
de Salud del Niño
San Borja



GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFLOURESCENCIA

VIII. Recomendaciones

1. Los resultados de la determinación de anticuerpos de una muestra única no deben ser usados para el diagnóstico de una infección reciente, se recomienda recoger muestras pareadas (aguda y convaleciente) para ser ensayadas paralelamente y determinar seroconversión.

IX. Autores, fecha y lugar

Instituto Nacional de Salud del Niño - San Borja
Laboratorio de Inmunología Especializada-Servicio de Patología Clínica.
Unidad de Apoyo al Diagnóstico y Tratamiento
Fecha de Elaboración: Marzo 2019
Vigencia: 02 años

Autores:

1. Dr. Emilio Aguilar Huauya eaguilar@insnsb.gob.pe
2. Lic. T.M. Yaquelina Chirinos Saire yachirinos@insnsb.gob.pe
3. Lic. T.M. Robert Reyna García rreyna@insnsb.gob.pe

X. Anexos

Anexo N° 01 (Orden Médica)



INSTITUTO NACIONAL DE SALUD DEL NIÑO SAN BORJA (INSNB)
AV. AGUSTIN DE LA ROSA TORO 1399 URB. JACARANDA II SAN BORJA
TELÉFONO : 51-1-2300600

PATOLOGIA CLINICA
(305326)

ORDEN MEDICA 467679

N° H.C. : [REDACTED] Cuenta : 620022

Paciente : [REDACTED]

Edad : 5 años 4 meses 12 días Sexo : MASCULINO

Tipo Plan : SIS N° filac.(230 2 78099608) N° FUA : 20661331

Resumen H :

Fecha Solicitud : 20/09/2018 11:51:00a.m Tipo Ate: Hospitalización

Procedencia : OBSERVACION

N° Cama : 528A

Prof de la Salud : GASTELU ESCALANTE Kety

CMP : 41144

N° Movimiento : 305326

Diagnóstico : J46.X ESTADO ASMÁTICO - ASMA AGUDA SEVERA

CodCPT	Cod SIS	Procedimiento	Fecha Programada	Tipo Prov.	Cant.
8834701		DETERMINACIÓN AC. IGM DE PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS Diag: J46.X -ESTADO ASMÁTICO - ASMA AGUDA SEVERA Just: pacientes con crisis asmática persistente sospecha de neumonía atípica DEBE LLEGAR UNA HORA ANTES DE SU HORA PROGRAMADA	20/09/2018 11:51:00 a.m.	INSTITUCIONAL	1

GASTELU ESCALANTE Kety

SELLO Y FIRMA DEL PRESCRIPTOR

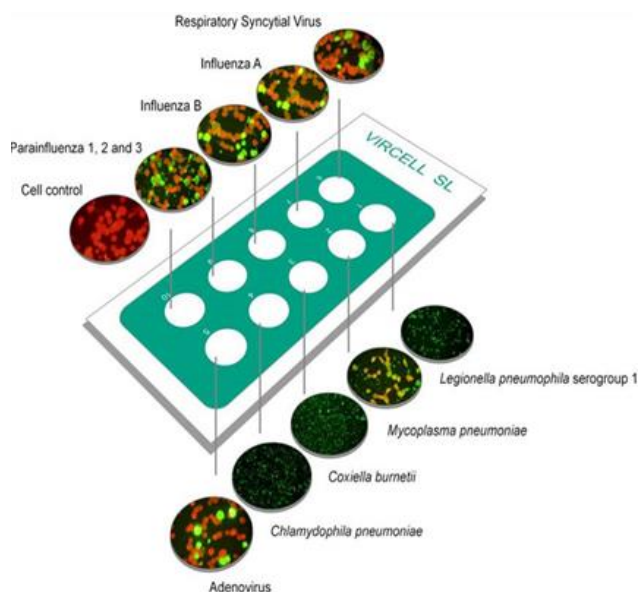
YCHIRINOS INSNB-05754 29/09/2018 05:19:16p.m.

Page 1 of 1

Marzo 2019	GP-037/INSN-SB/USDXT-PC/V.01	Página 9 de 10
------------	------------------------------	----------------

GUÍA DE PROCEDIMIENTO DE DETERMINACIÓN SÉRICA DE ANTICUERPOS IGM DE
PATÓGENOS ATÍPICOS Y VIRUS RESPIRATORIOS POR INMUNOFLUORESCENCIA

Anexo N° 02 (Fluorescencia
positiva)



XI. Bibliografía

1. Edelstein. Detection of antibodies to Legionella. En Rose, N.R., Conway de Macario, E., Fahey, J.L., Friedman, H., Penn, G.M. (eds). Manual of Clinical Laboratory Immunology (4^a Ed) American Society for Microbiology. Washington. 1992. pp:459-466.
2. Grdanoska T; Petrovska M; Cvetkovic D; Kotevska V; Dokic-Trajkovska E; Kondova I, and Panovski N. Pneumo-slide: serological investigation of human respiratory infections. 2nd Balkan Conference of Microbiology. Thessaloniki. 2001.
3. Hunt, J. G.; Field, P. R., and Murphy, A. M. Immunoglobulin responses to Coxiella burnetii (Q fever): single-serum diagnosis of acute infection, using an immunofluorescence technique. Infect Immun. 1983 Feb; 39(2):977-81.
4. Julkunen, I.; Lehtomaki, K., and Hovi, T. Immunoglobulin class-specific serological responses to adenovirus in respiratory infections of young adult men. J Clin Microbiol. 1986 Jul; 24(1):112-5.
5. Korppi, M.; Halonen, P.; Kleemola, M., and Launiala, K. The role of parainfluenza viruses in inspiratory difficulties in children. Acta Paediatr Scand. 1988 Jan; 77(1):105-11.
6. Lee, S. H.; Charoenying, S.; Brennan, T.; Markowski, M., and Mayo, D. R. Comparative studies of three serologic methods for the measurement of Mycoplasma pneumoniae antibodies. Am J Clin Pathol. 1989 Sep; 92(3):342-7.
7. Peter, O.; Dupuis, G.; Peacock, M. G., and Burgdorfer, W. Comparison of enzyme-linked immunosorbent assay and complement fixation and indirect fluorescent-antibody tests for detection of Coxiella burnetii antibody. J Clin Microbiol. 1987 Jun; 25(6):1063-7.
8. Toms, G. L.; Webb, M. S.; Milner, P. D.; Milner, A. D.; Routledge, E. G.; Scott, R.; Stokes, G. M.; Swarbrick, A., and Taylor, C. E. IgG and IgM antibodies to viral glycoproteins in respiratory syncytial virus infections of graded severity. Arch Dis Child. 1989 Dec; 64(12):1661-5.
9. Vikersfors, T.; Grandien, M.; Johansson, M., and Pettersson, C. A. Detection of an immunoglobulin M response in the elderly for early diagnosis of respiratory syncytial virus infection. J Clin Microbiol. 1988 May; 26(5):808-11.