



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 2 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

### 1 Objetivo:

El objetivo de este Procedimiento Operativo Normado (PON) es establecer los pasos a seguir para el procesamiento de muestras de suero para la detección de anticuerpos tipo IgG/IgM anti-*Treponema pallidum* y/o anticuerpos tipo IgG anti- *Chlamydia trachomatis* mediante la técnica de ELISA en la Sección de Bioquímica.

### 2 Alcance:

Este procedimiento se emplea para el procesamiento de muestras de suero para la detección de anticuerpos tipo IgG/IgM anti-*Treponema pallidum* y/o anticuerpos tipo IgG anti-*Chlamydia trachomatis* solicitada por las autoridades judiciales.

### 3 Referencias:

- Inserto de la prueba *Treponema pallidum* IgG ELISA DRG.
- Inserto de la prueba *Treponema pallidum* IgM ELISA DRG.
- Inserto de la prueba *Chlamydia trachomatis* IgG ELISA IBL Internacional.

### 4 Equipos y Materiales:

- Basurero para descarte de material biopeligroso punzocortante
- Erlenmeyer de 250 mL
- Gabacha blanca
- Guantes desechables de látex o similar
- Incubadora Fisher Scientific o similar con temperatura a 37 °C
- Lector de placas marca Rayto o similar
- Micropipeta de 5-50 uL
- Micropipeta de 20-200 uL
- Micropipeta de 100-1000 uL
- Micropipeta multicanal de 30-300 uL
- Microplaca recubierta IgG anti-*Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Microplaca recubierta IgM anti-*Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Microplaca recubierta IgG anti-*Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Plástico adhesivo (Kit comercial)
- Probeta de 10 mL
- Probeta de 200 mL

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 3 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

- Puntas para micropipeta de 5-50 uL
- Puntas para micropipeta de 20-200 uL
- Puntas para micropipeta de 100-1000 uL
- Puntas para micropipeta multicanal de 30-300 uL
- Refrigerador con temperatura a 4 °C
- Reloj con cronómetro
- Termómetro
- Toallas de papel absorbente desechables
- Tubo de plástico tipo eppendorf
- Vórtex

#### **5 Reactivos y Materiales de Referencia:**

- Agua destilada tipo Milli Q o similar.
- Alcohol 70%
- Conjugado IgG *Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Conjugado IgG *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Conjugado IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Control cut-off IgG *Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Control cut-off IgG *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Control cut-off IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Control negativo IgG *Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Control negativo IgG *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Control negativo IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Control positivo IgG *Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Control positivo IgG *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Control positivo IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 4 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

- 
- Diluyente para muestras IgG *Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Diluyente para muestras para IgG *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Diluyente para muestras para IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- IgG-RF-Sorbente para IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Solución de parada para IgG *Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Solución de parada para IgG *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Solución de parada para IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Tampón de lavado para IgG *Chlamydia trachomatis* (Kit comercial)
- Tampón de lavado para IgG *Treponema pallidum* (Kit comercial)
- Tampón de lavado para IgM *Treponema pallidum* (Kit comercial)

## 6 Condiciones Ambientales:

El procedimiento para el procesamiento para la detección de anticuerpos tipo IgG/IgM anti-*Treponema pallidum* y/o detección de anticuerpos tipo IgG anti-*Chlamydia trachomatis* mediante ELISA debe efectuarse en las áreas designadas para el análisis de muestras, en el Laboratorio de la Sección de Bioquímica.

## 7 Procedimiento:

**Nota 1:** Antes de iniciar cualquier procedimiento colóquese guantes desechables y gabacha, al inicio y al final del procedimiento limpie la mesa de trabajo con una toalla de papel desechable con alcohol al 70%.

### 7.1 Revisión de la solicitud de dictamen pericial:

**7.1.1** Revise detalladamente los datos suministrados y los análisis indicados en la solicitud de dictamen pericial F-083i.

### 7.2 Preparación de reactivos y muestras

**7.2.1** Lleve todos los reactivos y muestras a temperatura ambiente (20-25 °C).

**7.2.2** Diluya el tampón de lavado 1/20, mida 190 mL de agua destilada tipo Milli Q o similar en una probeta de 200 mL y 10 mL del tampón de lavado en una probeta de 10 mL y agregue ambos a un erlenmeyer de 250 mL, según el análisis a realizar.

**7.2.2.1 *Treponema pallidum*:** Este tampón de lavado diluido es estable 4 semanas a una temperatura de 2-8 °C. El volumen necesario por pocillo es de aproximadamente 3,5 mL, por lo que se debe preparar el volumen requerido según la cantidad de muestras de cada montaje.

**7.2.2.2 *Chlamydia trachomatis*:** Este tampón de lavado diluido es estable 5 días a temperatura ambiente (20-25 °C). El volumen necesario por pocillo es de

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 5 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

aproximadamente 2 mL, por lo que se debe preparar el volumen requerido según la cantidad de muestras de cada montaje.

**7.2.3** Mezclar bien.

**7.2.4** Rotule con el número BQM los tubos de plástico tipo eppendorf a utilizar.

**7.2.5 *Treponema pallidum* IgG:**

**7.2.5.1** Agregue 1 mL de diluyente para IgG *Treponema pallidum* a cada uno de los tubos de plástico tipo eppendorf utilizando la micropipeta de 100-1000 uL.

**7.2.5.2** Agregue 10 uL de la muestra a cada uno de los correspondientes tubos de plástico tipo eppendorf rotulados utilizando la micropipeta de 5-50 uL.

**7.2.5.3** Mezcle en el vórtex durante 4 segundos.

**7.2.5.4** Deje reposar durante al menos 15 minutos y mezcle de nuevo en el vórtex durante 4 segundos.

**7.2.6 *Treponema pallidum* IgM:**

**7.2.6.1** Agregue 0,5 mL de diluyente de muestra para IgM *Treponema pallidum* a cada uno de los tubos de plástico tipo eppendorf utilizando la micropipeta de 100-1000 uL.

**7.2.6.2** Agregue 10 uL de la muestra a cada uno de los correspondientes tubos de plástico tipo eppendorf rotulados utilizando la micropipeta de 5-50 uL.

**7.2.6.3** Mezcle en el vórtex durante 4 segundos.

**7.2.6.4** Mezcle bien el IgG-RF-Sorbente.

**7.2.6.5** Diluya la muestra prediluida 1/2, agregue en un tubo tipo eppendorf 60 uL de muestra prediluida y 60 uL de IgG-RF-Sorbente utilizando la micropipeta de 20-200 uL.

**7.2.6.6** Mezcle en el vórtex durante 4 segundos.

**7.2.6.7** Deje reposar a temperatura ambiente durante al menos 15 minutos, hasta un máximo de 2 horas y mezcle de nuevo en el vórtex durante 4 segundos.

**7.2.7 *Chlamydia trachomatis* IgG:**

**7.2.7.1** Agregue 1 mL de diluyente para muestras IgG *Chlamydia trachomatis* a cada uno de los tubos de plástico tipo eppendorf utilizando la micropipeta de 100-1000 uL.

**7.2.7.2** Agregue 10 uL de la muestra a cada uno de los correspondientes tubos de plástico tipo eppendorf rotulados utilizando la micropipeta de 5-50 uL y mezcle en el vórtex durante 4 segundos.

**7.3 Montaje de las muestras**

**7.3.1** Realice el esquema de montaje.

**7.3.2** Deje el pocillo A1 de la microplaca libre para el blanco de sustrato.

**7.3.3** Coloque 100 uL de los controles (negativo, cut-off y positivo) en la microplaca recubierta IgG anti-*Treponema pallidum* o en la microplaca recubierta IgM anti-*Treponema pallidum* o en la microplaca recubierta IgG anti-*Chlamydia trachomatis* según el esquema de montaje.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 6 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

**Nota 2:** Para *Chlamydia trachomatis* coloque los todos los controles por duplicado y para *Treponema pallidum* coloque por duplicado solamente el control cut-off; no se debe colocar por duplicado el control negativo ni el control positivo.

**7.3.4** Coloque 100 uL de las muestras diluidas en cada pocillo por separado según el esquema de montaje utilizando la micropipeta de 20-200 uL.

**7.3.5** Recubra las tiras de la microplaca con el plástico adhesivo suministrado en el kit.

**7.3.6** Incube 1 hora a 37 °C en la incubadora Fisher Scientific o similar.

**7.3.7** Retire el adhesivo.

**7.3.8** Descarte el líquido de los pocillos de forma vigorosa.

**7.3.9 *Treponema pallidum*:**

**7.3.9.1** Lave cada pocillo 5 veces con 300 uL de tampón de lavado diluido utilizando la micropipeta multicanal.

**7.3.10 *Chlamydia trachomatis*:**

**7.3.10.1** Lave cada pocillo 3 veces con 300 uL de tampón de lavado diluido utilizando la micropipeta multicanal.

**7.3.11** Descarte el volumen de forma vigorosa entre cada lavado y al final del proceso de lavado.

**7.3.12** Golpee con fuerza los pocillos en una toalla de papel absorbente desechable para remover las gotas residuales.

**7.3.13** Agregue 100 uL de conjugado a todos los pocillos excepto al A1 (Blanco de sustrato) utilizando la micropipeta de 20-200 uL..

**7.3.14** Incube 30 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en oscuridad. Evite la luz solar directa.

**7.3.15 *Treponema pallidum*:**

**7.3.15.1** Lave cada pocillo 5 veces con 300 uL de tampón de lavado diluido cada pocillo utilizando la micropipeta multicanal.

**7.3.16 *Chlamydia trachomatis*:**

**7.3.16.1** Lave cada pocillo 3 veces con 300 uL de tampón de lavado diluido utilizando la micropipeta multicanal.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 7 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

**7.3.17** Descarte el volumen de forma vigorosa entre cada lavado y al final del proceso de lavado.

**7.3.18** Descarte el líquido de los pocillos, golpee con fuerza los pocillos en una toalla de papel absorbente desechable para remover las gotas residuales.

**7.3.19** Agregue 100 uL de sustrato a todos los pocillos utilizando la micropipeta de 20-200 uL.

**7.3.20** Incube exactamente 15 minutos a temperatura ambiente (20-25 °C) en oscuridad.

**7.3.21** Agregue 100 uL de solución de parada a todos los pocillos utilizando la micropipeta de 20-200 uL y mida los valores de absorbancia en el lector de placas a 450/620 nm en un plazo máximo de 30 minutos.

#### **7.4 Lectura de las placas.**

**7.4.1** Encienda el lector de placas presionando el botón de encendido en la parte posterior del equipo, seleccione en la pantalla táctil del lector "Test" y espere que la lámpara este estable.

**7.4.2** Seleccione "OK".

**7.4.3** Seleccione "New", enseguida "Sifilis IgM, IgG" para *Treponema pallidum* o "IgG Ct" para *Chlamydia trachomatis* y presione "OK".

**7.4.4** En la pantalla táctil seleccione para la posición A1 "BK" para el blanco de sustrato, para las posiciones del control negativo seleccione "NC" y seleccione "Sample" en las demás posiciones que utilice.

**7.4.5** Presiones "Start".

**7.4.6** Anote en el esquema de montaje los valores de absorbancia obtenidos.

**7.4.7** Apague el lector de placas presionando en la pantalla táctil los comandos en el siguiente orden "Exit", "Cancel", "Power off", "Yes".

**7.4.8** Apague el lector de placas presionando el botón de apagado en la parte posterior del equipo.

**7.4.9** Guarde los reactivos en refrigeración a 4 °C.

**7.4.10** Descarte la microplaca y los tubos de plástico tipo eppendorf en basurero para descarte de material biopeligroso punzocortante.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 8 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

**7.4.11** Revise que los criterios de aceptación sean válidos completando las hojas de cálculo correspondiente a cada prueba (P-DCF-ECT-BQM-54-R01 o P-DCF-ECT-BQM-54-R02).

**7.4.12** Reporte los resultados en el SADCF.

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

**7.5.1** Multiplique el valor de absorbancia de la muestra por 10 y divida entre el valor de absorbancia promedio del control cut-off.

**7.5.2** Si el valor obtenido es mayor a 11, el resultado de la prueba es positivo.

**7.5.3** Si el valor obtenido está entre 9-11 (resultado dudoso), se recomienda repetir la prueba con una muestra fresca en 2 a 4 semanas. Si el resultado se mantiene en la zona de resultado dudoso, la muestra se considera negativa.

**7.5.4** Si el valor obtenido es menor a 9, el resultado de la prueba es negativo.

## **8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:**

### **8.1 *Treponema pallidum*:**

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Blanco	Menor a 0,100	Repetir el ensayo.
2	Valor de absorbancia del control negativo	Menor a 0,200	Repetir el ensayo.
3	Valor de absorbancia promedio del control cut-off	Entre 0,350-0,850	Repetir el ensayo.
4	Valor de absorbancia del control positivo	Entre 0,650-3,000	Repetir el ensayo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 9 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>		<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>

## 8.2 *Chlamydia trachomatis*:

No.	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Blanco	Menor a 0,100	Repetir el ensayo.
2	Valor de absorbancia promedio del control negativo	Menor a 0,200 y menor al control cut-off	Repetir el ensayo.
3	Valor de absorbancia promedio del control cut-off	Entre 0,150-1,300	Repetir el ensayo.
4	Valor de absorbancia promedio del control positivo	Mayor al control cut-off	Repetir el ensayo.

## 9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

## 10 Reporte de Análisis y Resultados:

**10.1** Proceda a reportar los datos obtenidos en el SADCF.

### Acciones Correctivas:

Si no se cumplen los criterios de aceptación el ensayo se debe repetir.

## 11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

Recuerde colocarse la gabacha y los guantes antes de manipular las muestras.

Debe asegurarse de limpiar el área de trabajo con alcohol de 70%, antes y después de realizar las pruebas.

Ante una eventual contaminación con la muestra analizada lave la zona afectada con abundante agua y jabón, posteriormente aplique alcohol al 70%. Informe inmediatamente a la Jefatura de Sección lo ocurrido.

## 12 Simbología:

ELISA: "Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay"

IgG: Inmunoglobulina G

IgM: Inmunoglobulina M

PON: Procedimiento de Operación Normado

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 01	PAGINA: 10 de 10
<b>PROCEDIMIENTO PARA LA DETECCIÓN DE ANTI-CUERPOS TIPO IgG/IgM ANTI-TREPONEMA PALLIDUM Y ANTICUERPOS TIPO IgG ANTI-CHLAMYDIA TRACHOMATIS MEDIANTE ELISA</b>	<b>P-DCF-ECT-BQM-54</b>	

SADCF: Sistema automatizado del Departamento de Ciencias Forenses

**13 Terminología:**

N/A

**14 Anexos**

N/A

COPIA NO CONTROLADA