



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y
MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR
INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)**

PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN
NORMADO ESPECIFICO

P-DCF-ECT-TOX-039

VERSION: 08

Rige desde: 05/10/2022

PAGINA: 1 de 25

Elaborado o modificado por: Sra. Lucía Lozano Galindo Técnico especializado 6 Dra. Lilliana Fallas Monge Perito Judicial 2B	Revisado por Líder Técnico: Dr. Marco Martínez Esquivel Líder Técnico Unidad de Trámite Rápido
Visto Bueno Encargado de Calidad: Dr. Marco Martínez Esquivel Encargado de Calidad, Sección de Toxicología	Aprobado por: Dr. Diego Arias Alfaro Jefe Sección de Toxicología

CONTROL DE CAMBIOS A LA DOCUMENTACIÓN

Versión	Fecha de Aprobación	Fecha de Revisión	Descripción del Cambio	SCD	Solicitado por
01	27/09/2018	03/12/2018	Versión Inicial del Procedimiento	014-2018	MME
02	03/12/2018	09/08/2019	Cambios de redacción, en el criterio de aceptación de los controles, forma de reportar e inclusión de hojas de cálculo.	020-2018	DAA
03	09/08/2019	10/02/2021	Modificación de tiempos aproximados y se refiere lavado de manos al Manual de seguridad y salud ocupacional.	022-2019	MME



DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL (OIJ)
PODER JUDICIAL, COSTA RICA

**DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y
MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR
INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)**

PROCEDIMIENTO DE OPERACIÓN
NORMADO ESPECIFICO

P-DCF-ECT-TOX-039

VERSION: 08

Rige desde: 05/10/2022

PAGINA: 2 de 25

04	10/02/2021	03/08/2021	Modificación del procedimiento e inclusión de resultados de validación por adquisición de nuevo equipo Evidence.	002-2021	DAA
05	03/08/2021	22/10/2021	Modificación del procedimiento por inclusión de PON de manejo general de casos de la sección de toxicología forense.	012-2021	DAA
06	22/10/2021	25/03/2022	Modificación para no duplicar información de controles de calidad	016-2021	DAA
07	25/03/2022	05/10/2022	Modificación por NCAP 2022-0001-TOX, nuevos criterios de aceptación y rechazo de controles y muestras, se incluye en el reporte los datos del equipo sin interpretación.	003-2022	DAA
08	05/10/2022		Modificación por inclusión de nuevas matrices para análisis y su informe de validación. Nuevas versiones de hojas de reporte de muestras por nuevas matrices.	015-2022	DAA

**ESTE PROCEDIMIENTO ES UN DOCUMENTO CONFIDENCIAL
PARA USO INTERNO DEL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES
SE PROHÍBE CUALQUIER REPRODUCCIÓN QUE NO SEA PARA ESTE FIN**

La versión oficial digital es la que se mantiene en la ubicación que la Unidad de Gestión de Calidad defina. La versión oficial impresa es la que se encuentra en la Unidad de Gestión de Calidad. Cualquier otro documento impreso o digital será considerado como copia no controlada

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 3 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

1 Objetivo:

El objetivo de este PON es establecer el procedimiento para la determinación presuntiva de drogas de abuso y medicamentos en muestras de origen biológico por medio de inmunoanálisis enzimáticos competitivos, en la Sección de Toxicología, del DCF, del O.I.J. de Costa Rica.

2 Alcance:

Este PON es aplicado para la determinación de drogas de abuso (tales como metanfetaminas, anfetaminas, barbitúricos, benzodiazepinas, metabolitos de cocaína, cannabinoides, metadona, opiáceos, fenciclidina, metilendioximetanfetamina (MDMA), antidepresivos tricíclicos, entre otros) en muestras de origen biológico como sangre total mediante la tecnología de Biochips de RANDOX, en el analizador Evidence Investigator y Evidence.

Este tipo de inmunoanálisis en Biochips provee únicamente resultados analíticos presuntivos, para obtener un resultado confirmatorio, deben seguirse los criterios para la identificación y confirmación de sustancias del PON de manejo general de casos de la sección de Toxicología.

La validación de la metodología en sangre total presenta los siguientes parámetros de validación para el equipo Evidence Investigator (referencia 3.6):

Analito o grupo de analitos	Límite detección (ng/mL)	Coefficiente de variación (CV%)
metanfetamina	75	Intra corrida: 1,85 - 15,32 % Inter corrida: 10,60 - 11,68%
barbitúricos	150	Intra corrida: 3,83 - 16,13 % Inter corrida: 13,45 - 14,89%
benzodiazepinas I	25	Intra corrida: 2,47 - 14,15 % Inter corrida: 12,04 - 19,62%
benzodiazepinas II	25	Intra corrida: 1,85 - 16,01 % Inter corrida: 12,55- 16,49%
metabolitos de cocaína	50	Intra corrida: 3,15 - 14,80 % Inter corrida: 11,94 - 19,04%
cannabinoides	50	Intra corrida: 1,01 - 14,97 % Inter corrida: 10,56 - 15,88 %
metadona	50	Intra corrida: 2,80 - 19,34 % Inter corrida: 13,42 - 18,01%
opiáceos	100	Intra corrida: 0 - 11,51 % Inter corrida: 11,34 - 17,05 %
fenciclidina	20	Intra corrida: 1,68 - 20,04 % Inter corrida: 18,53 - 25,33 %
metilendioximetanfetamina (MDMA)	75	Intra corrida: 1,08 - 12,95% Inter corrida: 6,05 - 14,68 %
antidepresivos tricíclicos	100	Intra corrida: 2,48 - 18,15 % Inter corrida: 7,58 - 19,33%

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 4 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

La validación de la metodología en sangre total presenta los siguientes parámetros de validación para el equipo Evidence (referencia 3.7):

Analito o grupo de analitos	Límite detección (ng/mL)	Coefficiente de variación (CV%)
anfetamina	100	11,64 – 14,80%
metanfetamina	300	8,44 – 18,33%
barbitúricos	150	5,31 – 6,69%
benzodiazepinas I	15	8,63 – 10,49 %
benzodiazepinas II	15	11,46 -19,81%
metabolitos de cocaína	30	7,40- 11,31%
cannabinoides	15	9,60- 13,65 %
metadona	30	5,87 -8,82 %
opiáceos	30	8,27 -15,36 %
fenciclidina	15	4,14 - 6,61 %
metilendioximetanfetamina (MDMA)	50	9,02 - 18,74 %
antidepresivos tricíclicos	150	8,55 -11,75 %

La validación de la metodología en tejidos (Hígado y músculo rojo) presentan los siguientes parámetros de validación para el equipo Evidence (referencia 3.8):

Para músculo rojo:

Analito o grupo de analitos	Límite detección (ng/mL)	Coefficiente de variación (CV%)
metanfetamina	400	6,37-10,09%
barbitúricos	2000	0-11,90%
benzodiazepinas I	80	8,92 – 16,78%
benzodiazepinas II	240	8,48 – 12,15%
metabolitos de cocaína	240	10,20- 11,93%
metadona	400	0 – 11,18%
opiáceos	400	9,31 – 11,22%
cannabinoides	480	0 – 10,79%
metilendioximetanfetamina (MDMA)	240	6,71 – 7,92%
antidepresivos cíclicos	400	5,33 – 9,71%

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 5 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

Para hígado:

Analito o grupo de analitos	Límite detección (ng/mL)	Coefficiente de variación (CV%)
metanfetamina	400	9,74- 12,19 %
barbitúricos	2000	0 - 14,92 %
benzodiazepinas I	80	16,40 - 22,61 %
benzodiazepinas II	240	14,20 - 16,69 %
metabolitos de cocaína	240	5,94 - 18,26 %
metadona	400	20,20- 34,39 %
opiáceos	400	9,04 - 16,81 %
cannabinoides	480	0 - 19,91 %
metilendioximetanfetamina (MDMA)	240	5,70 - 12,01%
antidepresivos tricíclicos	400	16,88 - 23,06%

3 Referencias:

- 3.1 American Academy of Forensic Sciences (AAFF), Academy Standards Board (ASB) (ANSI/ASB Standard 036, 1st Ed. 2019), Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology. American Academy of Forensic Sciences.
- 3.2 Insertos de los reactivos, controles y calibradores aportados por la casa comercial RANDOX.
- 3.3 Manual del operador Evidence Investigator, V03.0.1, Julio 2016.
- 3.4 Manual del operador Evidence, versión en inglés "EVIDENCE OPERATOR MANUAL V 3.0 - April 2014".
- 3.5 Standard Practices for Method Validation in Forensic Toxicology, SWGTOX Doc 003, revisión 1, published May 20, 2013.
- 3.6 Validación de la determinación de drogas de abuso y medicamentos en sangre por inmunoensayo (Biochips de RANDOX). Informe 003-TOX-VAL-INC-2018.
- 3.7 Validación de la determinación de drogas de abuso y medicamentos en sangre por inmunoensayo (Biochips de RANDOX). Informe 005-TOX-VAL-2020.
- 3.8 Validación de la determinación de drogas de abuso y medicamentos en tejido por inmunoensayo (Biochips de RANDOX). Informe 004-TOX-VAL-2022.

4 Equipos y Materiales:

Agitador de tubos de ensayo por inversión (rotatorio).

Agitador disruptor SPEX 1600 Mini-G o similar.

Agitador por vibración tipo vortex.

Balón aforado de 1 L o similar

Balines de 4 mm de acero, SPEX 2150 o similar

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 6 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

[Balanza semi analítica, rango 0,001 a 100 gramos \(\$\pm\$ 0,002 gramos\), similar o superior.](#)

Bandeja de plástico

Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

Beakers de 50 ml o similar

Bitácora de Control y uso de Equipo: Evidence Investigator

Bitácora de Control y uso de Equipo: RANDOX Evidence

Botellas de plástico con tapa de rosca de 125 mL, 250 mL, 500 mL o similar.

Botella de vidrio ambar de 1 L o similar

Bolsas para desechos bioinfecciosos

Cámara de bioseguridad

Códigos de barras de calibradores y controles

Congelador ($\leq 0^{\circ}\text{C}$)

Cronómetro (división de escala de 1 segundo)

Discos compactos con la información de calibradores y de controles de cada kit.

Evidence Investigator EI-15331 (con software V 2.0.0) o similar

RANDOX Evidence EV 180/186 (con software V 2.0.2.1) o similar

Formulario "Esquema de trabajo: Determinación de drogas de abuso y medicamentos en matrices biológicas por inmunoensayo (BIOCHIPS RANDOX)"

[Formulario "Reporte de resultados de muestras del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX \(Equipo: Evidence\)", versión vigente.](#)

[Formulario "Reporte de resultados de muestras de tejido del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX \(Equipo: Evidence\)", versión vigente.](#)

Horno de laboratorio, rango 20-240° C (\pm 10° C).

Gabacha.

Galones plásticos de 10 L o similar

Gradillas para tubos.

Guantes desechables.

Hoja de cálculo "Manejo de datos para el reporte de resultados de muestras del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

Hoja de cálculo "Manejo de datos para el reporte de resultados de controles del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

Hoja de cálculo "Manejo de datos para el reporte de resultados de muestras del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence Investigator)", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

P-DCF-GCG-JEF-001-R3, Versión 01
Emitido y Aprobado por Unidad de Gestión de Calidad

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 7 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

Hoja de cálculo "Manejo de datos para el reporte de resultados de controles del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence Investigator)", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

Hoja de cálculo "Manejo de datos para el reporte de resultados de muestras de tejido del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)", versión actualizada, elaborada por el Dr. Marco Antonio Martínez Esquivel.

Homogeneizador de tejidos IKA Ultra Turrax T-18 o con tubos mezcladores desechables o similar.

Lentes de seguridad.

Listado de límites administrativos o de decisión (LA) o de reporte de las sustancias analizadas en la Sección de Toxicología.

Papel toalla desechable

Piseta

Pipetas plásticas de transferencia de 5 mL o similar, nuevas.

Pon uso y manejo del equipo Evidence (RANDOX), versión vigente.

Probetas de 50 mL y 1000 mL, o similar.

Refrigerador (>0 a 10°C).

Recipiente plástico para desechos punzo-cortantes, de 1 L o similar.

Medidor de temperatura Testo 175-H2 o similar, rango -20 a 70 °C ($\pm 0,5^\circ\text{C}$).

Micropipeta de 200 ul y 1000 ul con puntas nuevas

Termoagitador, serie: 1011915050075.

Tijera de disección.

Tubos de vidrio con un volumen aproximado de 10 mL o similar

Pinza de disección

Recipiente de vidrio ambar para preparar el reactivo indicador operativo

Viales tipo eppendorf de 500 uL o similar

Nota 01: Las indicaciones para el lavado de cristalería y material plástico reutilizable se encuentran en el PON Manejo general de casos de la sección de Toxicología forense.

Descarte la cristalería quebrada en un recipiente plástico para desechos punzo-cortantes.

Para los tubos de vidrio de 10 mL con anticoagulante, primero descarte el anticoagulante, lave con agua de grifo, lave tres veces con agua desionizada y déjelos secar en posición invertida.

Los Galones de plásticos de 10 L o similar se enjuagan con agua desionizada y se lavan según lo indica el PON de Uso y manejo del Equipo Evidence (RANDOX).

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 8 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

5 Reactivos y Materiales de Referencia:

Agua desionizada

Acetonitrilo con 0,1% de ácido fórmico. (Anexo 01).

Acetonitrilo con 1% de ácido acético. (Anexo 01).

Biochips tipo DOA I WB P o similar

Calibradores

Cloro concentrado, grado comercial

Concentrado de tampón de lavado (BUF WASH conc.)

Concentrado de fluido de desplazamiento (DISP FL conc.)

Conjugado (CONJ)

Controles de los reactivos DOA I WB P CONTROL 1 y DOA I WB P CONTROL 2

Diluyente de análisis (DIL ASY)

Diluyente de muestras (DIL SPE)

Disolución de cloro al 0,5 % (ver Anexo No.1)

Jabón alcalino comercial

Matriz hígado blanco, mínimo 2 gramos.

Matriz músculo blanco, mínimo 2 gramos.

Matriz sangre blanco, mínimo 10 mL.

REGN signal 841: Luminol-EV841 (LUM-EV841), Peróxido (PX)

Tubos con sales de QuEChERS (AOAC), sulfato de magnesio/acetato de sodio. Ver Anexo 1. Verificar según "Procedimiento para el manejo general de casos en la sección de Toxicología Forense, versión vigente".

6 Condiciones Ambientales:

El montaje de las muestras se puede realizar a temperatura ambiente.

La temperatura del área donde se realiza la incubación de las muestras y la lectura del ensayo debe estar entre +16°C a +25 °C para Evidence Investigator.

Para el Evidence las condiciones se indican en el PON Uso y Manejo del equipo Evidence (RANDOX).

7 Procedimiento:

7.1 Labores previas al análisis

Nota 02: Siga las indicaciones del PON de Manejo general de casos de la sección de toxicología forense en cuanto a la manipulación, almacenamiento y análisis en serie de

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 9 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

material biológico, utilice las Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional según se indican en el punto 11 de este procedimiento.

- 7.1.1** Limpie, como funcionario encargado del análisis, la mesa de trabajo o cámara de bioseguridad con disolución de cloro al 0,5% utilizando toallas desechables, previo al montaje de calibradores, controles o muestras
- 7.1.2** Prepare el área de trabajo con papel Kraft (la limpieza y preparación del área de trabajo puede realizarse desde el día anterior al montaje del análisis).
- 7.1.3** Deje los reactivos, calibradores, controles y muestras en el área de análisis aproximadamente media hora antes de proceder con los análisis.
- 7.1.4** Seleccione para este análisis de la Base de datos "Manejo de solicitudes y RAS", los objetos registrados en el SADCF y pendientes de análisis que pueden formar parte de un grupo de muestras de análisis para la detección presuntiva de drogas de abuso. Este listado normalmente lo genera el perito encargado de la pericia, pero podría generarlo otro perito de la unidad de Trámite rápido.
- 7.1.5** Entregue la lista al encargado de la bodega de indicios para que proceda a buscar las muestras y entregarlas por el SADCF al funcionario encargado del análisis.
- 7.1.6** Reciba, como funcionario encargado del análisis, el grupo de muestras para análisis en serie por medio del SADCF, verifique los números de objeto recibidos.
- 7.1.7** Elabore, como funcionario encargado de reportar los resultados, el proceso de análisis en serie (RAS) en el SADCF e imprima las etiquetas con códigos microQR o de barras para todas las muestras.
- 7.1.8** Si se cuenta con curva vigente realice el montaje de controles como se indica en el punto 7.2.3
- 7.1.9** De ser necesario realizar una nueva curva de calibración por cambio de lote de reactivos o resultados inaceptables de controles (ver punto 8.2), proceda según el equipo a utilizar.

7.2 Montaje de calibradores, controles y muestras en Evidence Investigator:

- 7.2.1** Cargue los CD con la información de los calibradores en la computadora antes de realizar cualquier lectura en el equipo, refiérase a la sección 3, apartado 3.4.2 del Manual del operador para los detalles.
- 7.2.2** Reconstituya los nueve puntos de calibradores (DOA I WB P CAL) en 1ml de agua desionizada y coloque en agitación suave por aproximadamente 30 minutos. Son estables durante 7 días en refrigeración y hasta 14 días a -20 °C.
- 7.2.3** Cargue el CD con la información del control de calidad en la computadora antes de realizar cualquier lectura en el equipo, refiérase a la sección 3, apartado 3.4.1 del Manual del operador para los detalles.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 10 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

7.2.4 Reconstituya los controles Evidence® DOA I WB P (EV 3750) en 1ml de agua desionizada (o utilice alguno reconstituido previamente) y coloque en agitación suave por aproximadamente 30 min. Son estables por 5 días en refrigeración y hasta 14 días a -20°C.

Nota 03: Puede almacenar en congelación los controles en viales tipo eppendorf protegidos de la luz, en alícuotas de 200 ul.

7.2.5 Utilice como control negativo 500 uL de sangre blanco y centrifugue aproximadamente a 13000 rpm durante 10 minutos o 4000 rpm durante 20 minutos.

7.2.6 Diluya el control en un factor cuatro con diluyente de muestras (DOA I WB P DIL SPE), para ello agregue 50 µl del sobrenadante del blanco de sangre centrifugada con 150 µl de diluyente de muestras. Analice junto con los controles reconstituidos.

7.2.7 Analice la curva de calibración y los controles, refiérase al Manual del operador para los detalles.

7.2.8 Revise si la curva de calibración cumple los criterios de aceptación del punto 8.1.

7.2.9 Revise el resultado de los controles en el equipo en el apartado "QC Display" mediante los gráficos de control o registre los resultados de los controles en la Hoja de cálculo "Manejo de datos para el reporte de resultados de controles del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence Investigator)", si cumplen con los criterios de aceptación continúe con el montaje de las muestras. De lo contrario siga lo indicado en el punto 8.2 de este procedimiento.

7.2.10 Realice el esquema de trabajo con el formulario "Esquema de trabajo: Determinación de drogas de abuso y medicamentos en matrices biológicas por inmunoensayo (BIOCHIPS RANDOX)" suministrado (ver anexo 2).

7.2.11 Rotule o etiquete por duplicado los viales tipo eppendorf o similar para cada muestra a analizar. Una serie será utilizada para agregar la muestra de sangre y la otra para la dilución.

7.2.12 Agregue en la primera serie de viales aproximadamente 500 µl de las muestras incógnitas de sangre y centrifugue aproximadamente a 13000 rpm durante 10 minutos o 4000 rpm durante 20 minutos.

Nota 04: Los puntos 7.2.10, 7.2.11 y 7.2.12 se pueden realizar de previo. Las alícuotas de las muestras de sangre (sin centrifugar) se deben guardar en refrigeración.

7.2.13 Entregue por medio del SADCF los tubos recibidos para análisis al encargado de la bodega de indicios o mantenga en área de seguridad intermedia bajo su custodia hasta que se puedan entregar.

7.2.14 Diluya las muestras en un factor cuatro con diluyente de muestras (DOA I WB P DIL SPE), para ello agregue 50 µl del sobrenadante de cada muestra de sangre centrifugada

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 11 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

en la otra serie de viales con 150 µl de diluyente de muestras. Son estables por 24 horas en refrigeración y hasta 7 días a -20 °C.

7.2.15 Coloque en el vortex por aproximadamente 30 segundos.

7.2.16 Retire de su empaque la cantidad de bandejas de biochips que necesite. Coloque en la superficie de trabajo la bandeja portadora, suministrada con el termoagitador Investigator.

Nota 05: Los Biochips después de abiertos son estables hasta 7 días si se almacenan en su empaque original con desecante y sellado con cinta a temperatura ambiente.

7.2.17 Introduzca cada una de las bandejas de biochips en la bandeja portadora asegurándose de que quedan planas y acopladas en su posición.

Nota 06: Todas las operaciones de adición, lavado e incubación de muestras, controles, calibradores y reactivos se realizan en la bandeja portadora. De modo que las bandejas de biochips sólo deben retirarse para la adición final del reactivo indicador y para la fase de detección del procedimiento. Cuando realice las operaciones de adición la punta de la pipeta debe apuntar hacia la parte trasera del pocillo y no tocar el fondo.

7.2.18 Pipetee 120 µl de diluyente de análisis por pocillo.

7.2.19 Pipetee 60 µl de calibrador, control o muestra diluida por pocillo.

7.2.20 Pipetee 120 µl de conjugado por pocillo. Mezcle golpeando suavemente el borde de la bandeja portadora.

7.2.21 Equilibre el termoagitador a +25°C por aproximadamente 30 minutos antes de usarlo.

7.2.22 Coloque la bandeja portadora en la placa base del termoagitador. Incube durante aproximadamente 30 minutos a +25 °C y 330 rpm.

7.2.23 Tras la incubación, retire del termoagitador la bandeja portadora que contiene los biochips. Deseche en una pila con flujo de agua los reactivos que contienen los biochips aplicando un movimiento rápido y preciso a la bandeja portadora.

7.2.24 Inmediatamente, realice 6 ciclos de lavado rápido, utilice tampón de lavado diluido (ver anexo 1), añada aproximadamente 350 µl de tampón de lavado a cada pocillo (trate de no sobrepasar la mitad del área del pocillo), golpee suavemente todos los bordes de la bandeja portadora para desprender los reactivos atrapados debajo del biochip y, finalmente, aplique un movimiento rápido y preciso para desecharlos. No llene excesivamente los pocillos durante el lavado para reducir el riesgo de contaminación entre pocillos.

7.2.25 Realice 6 ciclos de lavado más. En cada ciclo, golpee suavemente todos los bordes de la bandeja portadora durante aproximadamente 10-15 segundos y sumerja los biochips en tampón de lavado durante aproximadamente 2 minutos antes del siguiente lavado.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 12 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

7.2.26 Tras el lavado final, llene los pocillos con tampón de lavado y déjelos empapar hasta el momento de efectuar la detección por imagen.

Nota 07: Ninguna bandeja de biochips debe dejarse empapar durante más de 30 minutos.

7.2.27 Para la detección de imagen, encienda el equipo Evidence Investigator

7.2.28 Mezcle en una proporción 1:1 el luminol-EV841 con peróxido para obtener el reactivo indicador operativo EV841 (se recomienda añadir el luminol-EV841 al componente de peróxido) y coloque en agitación suave durante aproximadamente 15 minutos. Es estable por 4 horas.

Nota 08: Calcule el volumen de reactivo indicador operativo EV841 que necesita para un volumen de 250 ul por pocillo, de modo que una bandeja de biochips (9 pocillos + volumen muerto) requiere aproximadamente 3 ml (1,5 ml de cada componente).

7.2.29 Cargue la secuencia e ingrese uno por uno los biochips en el orden establecido. Refiérase a la sección 3 del manual del operador, donde se describe como crear las listas de trabajo, apartado 3.6.2.

7.2.30 Extraiga de la bandeja portadora el primer soporte de biochips que se someterá a detección por imagen. Inmediatamente antes de añadir el indicador, elimine el tampón de lavado realizando un movimiento rápido y preciso; aplique un paño sin pelusa a la bandeja de biochips para eliminar todo el tampón de lavado sobrante, puede colocar la bandeja envuelta en el paño y darle ligeros golpes con sus manos para eliminar el sobrante.

7.2.31 Añada 250 µl de reactivo indicador operativo EV841 a cada pocillo de biochip y cúbralo para protegerlo de la luz.

7.2.32 Coloque la bandeja de biochips en el Evidence Investigator™ cuando hayan transcurrido aproximadamente 2 minutos.

7.3 Montaje de calibradores, controles y muestras de sangre total en Evidence:

7.3.1 Cargue los CD con la información de los calibradores en la computadora antes de realizar cualquier lectura en el equipo y antes de abrir el software de este, refiérase al PON Uso y Manejo del equipo Evidence (RANDOX), sección de calibración.

7.3.2 Reconstituya los nueve puntos de calibradores (DOA I WB P CAL) en 1ml de agua desionizada y coloque en agitación suave por aproximadamente 30 minutos.

Nota 09: Utilice para el montaje 500 ul y almacene el sobrante de los calibradores en su envase original, los mismos son estables por 5 días en refrigeración y por 14 días a -20 C.

7.3.3 Cargue el CD con la información del control de calidad en la computadora antes de realizar cualquier lectura en el equipo y antes de abrir el software de este, refiérase al PON Uso y Manejo del equipo Evidence (RANDOX), sección de controles.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 13 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

- 7.3.4** Reconstituya los controles Evidence® DOA I WB P (EV 3750) en 1ml de agua desionizada (o utilice alguno reconstituido previamente) y coloque en agitación suave por aproximadamente 30 min. Son estables por 5 días en refrigeración y por hasta 14 días -20°C.
- 7.3.5** Utilice como control negativo 500 uL de sangre blanco y centrifugue aproximadamente a 13000 rpm durante 10 minutos o 4000 rpm durante 20 minutos.
- 7.3.6** Diluya el control en un factor final de doce con diluyente de muestras (DOA I WB P DIL SPE), para ello agregue 150 µl del sobrenadante del blanco de sangre centrifugada con 450 µl de diluyente de muestras. Realice una segunda dilución con 250uL de la primera dilución con 500uL de diluyente de muestras. Analice junto con los controles reconstituidos.
- 7.3.7** Analice la curva de calibración y los controles, refiérase al PON Uso y Manejo del equipo Evidence (RANDOX) para más detalles.
- 7.3.8** Revise si la curva de calibración cumple los criterios de aceptación del punto 8.1.
- 7.3.9** Revise el resultado de los controles en el equipo en el apartado "QC Display" mediante los gráficos de control o registre los resultados de los controles en la Hoja de cálculo "Manejo de datos para el reporte de resultados de controles del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)", si cumplen con los criterios de aceptación continúe con el montaje de las muestras. De lo contrario siga lo indicado en el punto 8.2 de este procedimiento.
- 7.3.10** Rotule o etiquete por duplicado los viales tipo eppendorf o similar para cada muestra a analizar, los primeros para realizar la alícuota de la muestra incógnita de sangre, y el segundo juego para realizar la dilución 1/4.
- 7.3.11** Rotule o etiquete los tubos de vidrio con volumen aproximado de 10 mL o similar para cada muestra a analizar, en estos se realiza la dilución 1/12 y son los utilizados para el muestreo en el equipo EVIDENCE.
- 7.3.12** Agregue en la primera serie de viales tipo eppendorf o similar aproximadamente 500 µl de las muestras de sangre y centrifugue aproximadamente a 13000 rpm durante 10 minutos o 4000 rpm durante 20 minutos.
- Nota 10:** Los puntos 7.3.10, 7.3.11 y 7.3.12 se pueden realizar de previo. Las alícuotas de las muestras de sangre (sin centrifugar) se deben guardar en refrigeración.
- 7.3.13** Una vez centrifugados los viales tipo eppendorf o similar, tome 150 µL del sobrenadante agregue al tubo tipo eppendorf o similar y agregue 450 ul del diluyente de muestra (DIL SPE) (dilución ¼).
- 7.3.14** Agite en el vortex por aproximadamente 30 segundos.
- 7.3.15** De la dilución anterior tome 250 ul y diluya en 500 ul del diluyente de muestra (DIL SPE) en los tubos de vidrios de 10 ml o similar y agitar en el vortex por aproximadamente 30 segundos, verificando que no se formen burbujas en la dilución.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 14 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

7.3.16 Para el montaje de las muestras, refiérase al PON Uso y Manejo del equipo Evidence (RANDOX).

7.4 Extracción y montaje de controles y muestras de tejido (hígado y músculo rojo) en Evidence:

7.4.1 Revise si en el registro de análisis en serie hay muestras de hígado o músculo, de ser así incluya blanco de esa matriz. Para ello utilice un tubo con el tejido blanco del lote en uso, previamente pesada y picada finamente. En el caso de que el blanco de tejido haya sido homogenizado previamente, omita para este blanco los pasos 7.4.2 al 7.4.8 inclusive.

Nota 11: Solicite las muestras con aproximadamente 24 horas de anticipación, para que se descongelen en refrigeración.

7.4.2 Pese tres gramos de cada una de las muestras incógnitas de tejido utilizando balanza semianalítica.

7.4.3 Proceda a cortar finamente cada muestra de tejido. Utilice pinza y tijera de disección.

7.4.4 Coloque dentro de un tubo cónico de 15 mL o similar, 3 gramos de muestra cortada finamente.

7.4.5 Agregue a cada muestra incógnita, 9 mL de agua desionizada (dilución 1:4).

7.4.6 Homogenice con homogeneizador de tejidos aproximadamente por 1 min. Si utiliza el homogeneizador con tubos desechables no realice los pasos descritos en 7.4.7 y 7.4.8

Nota 12: Los puntos 7.4.2 al 7.4.6 se pueden realizar de previo. Los homogenizados de las muestras de tejido se deben guardar en refrigeración.

7.4.7 Si en la secuencia hay más de una muestra incógnita de tejido, previo a la homogenización de cada muestra, desarme el homogeneizador de tejidos y enjuáguelo en la tina con disolución de hipoclorito de sodio al 0,5% eliminando primero todos los restos de tejido, luego lave con jabón alcalino con hisopo o cepillo, enjuague con agua de grifo, con agua desionizada y con etanol antes utilizarlo de nuevo. Arme de nuevo el homogeneizador y acciónelo dentro de un beaker de 50 mL o similar con agua desionizada por aproximadamente 15 segundos. Deseche el agua.

7.4.8 Tome 0,5 mL del licuado y colóquelo en microtubos de 1,5 a 2 mL o similar. Idealmente debe conservarse el resto del homogenizado en congelación hasta el reporte del análisis.

7.4.9 Devuelva, a través del SADCF, las muestras al encargado de la bodega de indicios o algún otro funcionario que las necesite o consérvelas en custodia intermedia.

7.4.10 Coloque dos balines metálicos de 4 mm a todas las muestras incógnitas y controles.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 15 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

- 7.4.11** Aplique los pasos 7.4.11 al 7.4.13 a cada muestra o control. Agregue el contenido de un tubo (250 mg) de las sales de QuEChERS AOAC (MgSO₄ y Acetato de sodio) a cada tubo.
- 7.4.12** Agregue 0,5 mL de acetonitrilo con 1% de ácido acético a cada tubo.
- 7.4.13** Aplique vortex por aproximadamente 30 segundos.
- 7.4.14** Encienda el equipo disruptor 1600 MiniG y cerciórese que está configurado a una velocidad de 1000 RPM y un tiempo de 1 minuto. La agitación también puede realizarse manualmente con el antebrazo.
- 7.4.15** Centrifugue a 9000 rpm por 6 min a 15°C aproximadamente.
- 7.4.16** Tome 250 µL de la parte superior del extracto y deposítela en un vial de vidrio de 2 mL o similar.
- 7.4.17** Coloque en el sistema de evaporación con nitrógeno y lleve a sequedad, esto puede tardar aproximadamente 30 min. La temperatura de baño debe ser inferior a 40 °C.
- 7.4.18** Agregue 1 mL de diluyente de muestra (DIL SPE) a cada extracto, aplique vortex por aproximadamente 30 segundos y trasvase a tubos de vidrio de 10 mL o similar.
- 7.4.19** Realice el análisis de las muestras de la misma forma que para las muestras de sangre total.

8 Criterios de Aceptación o Rechazo de Resultados:

8.1 Curva de calibración:

Nº	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Valor r de la curva de calibración	Valor r del ajuste de curva \geq Valor r del ajuste de curva estándar	Si esto no se cumple debe repetirse la curva de calibración.
2	Número de niveles de la curva de calibración	Mínimo siete puntos y dentro de estos debe de estar el número nueve.	Si esto no se cumple debe repetirse la curva de calibración.

8.2 Controles:

Nº	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Valor de los controles positivos que se utilizan para verificar la exactitud de la curva de calibración.	Promedio asignado \pm 3 SD	Si no se cumple con el límite aceptable debe repetirse los controles. Si vuelve a obtenerse resultados inaceptables utilice otro frasco de control. De repetirse los resultados inaceptables realice una nueva curva de calibración.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES		VERSIÓN 08	PAGINA: 16 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039	

2	Valor del control negativo	No detección de las drogas de interés.	Si no se cumple con el límite aceptable debe repetirse el control.
3	Valor numérico en los resultados de las drogas analizadas.	Al menos una droga en cada biochip debe tener resultado diferente de cero.	Si todas las drogas en un mismo biochip tienen resultado en cero, se deben repetir los controles. Si vuelve a obtenerse resultados en cero para todas las drogas se debe contactar al servicio técnico.

8.3 Muestras:

N°	Criterio de Aceptación	Valor Límite	Corrección Aplicable
1	Resultado obtenido en la muestra	Contar con un resultado	Si no se cuenta con un resultado o si el resultado es cero para todas las drogas analizadas debe repetirse el análisis de la muestra.

9 Cálculos y evaluación de la incertidumbre:

N/A

10 Reporte de Análisis y Resultados:

10.1 Para el reporte de los resultados, tome en cuenta los criterios generales para la identificación y reporte de sustancias indicados en el PON Manejo General de Casos en la Sección de Toxicología Forense.

10.2 Los resultados se procesan automáticamente utilizando el software específico del equipo. Revise que para ninguno de los controles o muestras, los resultados sean cero para todas las drogas analizadas.

10.3 Exporte los resultados originales desde el equipo a un dispositivo USB. Además, genere un archivo PDF con los datos de los controles y otro con los datos de las muestras.

10.4 Introduzca el conjunto de resultados obtenidos para los controles en la Hoja de cálculo correspondiente según el equipo utilizado: "Manejo de datos para el reporte de resultados de controles del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)" o "Manejo de datos para el reporte de resultados de controles del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence Investigator)", versión actualizada y genere el reporte en formato PDF.

10.5 Combine el reporte generado en PDF del punto 10.3 (datos de los controles) con el reporte generado en el punto 10.4. El archivo final se debe incorporar en el SADCF.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 17 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

- 10.6** Introduzca el conjunto de resultados obtenidos de las muestras de sangre total en la Hoja de cálculo correspondiente según el equipo utilizado: "Manejo de datos para el reporte de resultados de muestras del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)" o "Manejo de datos para el reporte de resultados de muestras del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence Investigator)", versión actualizada y genere el reporte en formato PDF del Formulario "Reporte de resultados de muestras del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)", versión vigente.
- 10.7** Introduzca el conjunto de resultados obtenidos de las muestras de tejido en la Hoja de cálculo correspondiente: "Manejo de datos para el reporte de resultados de muestras de tejido del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)", versión actualizada y genere el reporte en formato PDF del Formulario "Reporte de resultados de muestras de tejido del inmunoensayo BIOCHIPS RANDOX (Equipo: Evidence)", versión vigente.
- 10.8** Combine el reporte generado en PDF del punto 10.3 (datos de las muestras) con el reporte generado en el punto 10.6 o 10.7, según el tipo de matriz analizada. El archivo final se debe incorporar en el SADCF.
- 10.9** Los resultados por Evidence Investigator y RANDOX Evidence se reportan en el Sistema Automatizado del Departamento de Ciencias Forenses.
- 10.10** Si el resultado es menor al límite administrativo se reporta en el SADCF como no se detectó.
- 10.11** Si el resultado es mayor al límite administrativo se reporta en el SADCF como positivo presuntivo.

Nota 11: Siga las directrices para el análisis en serie indicadas en el PON de manejo general de casos de la Sección de Toxicología forense.

11 Medidas de Seguridad y Salud Ocupacional:

Las muestras deben manipularse con todos los cuidados que requieren las muestras de origen biológico. Utilice siempre gabacha, anteojos de seguridad o careta y guantes desechables al manipular las muestras.

Los tubos con muestras deben ser transportadas en las gradillas destinadas para este uso.

Cuando salga del área de laboratorio, deseche los guantes y lávese las manos, como lo indica el Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del DCF.

Si ocurre un derrame de algún reactivo refiérase al Manual de Seguridad y Salud Ocupacional del Departamento de Ciencias Forenses.

Informe cualquier accidente donde se presuma contacto con material bio-infeccioso al Jefe de Sección o quién este encargado del laboratorio en ese momento para que se le indique el procedimiento a seguir.

Si ocurre contacto de algún reactivo con los ojos, acuda inmediatamente a la ducha para ojos que se encuentra en el laboratorio.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 18 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

Si ocurre algún derrame importante de algún reactivo en la ropa o la piel utilice la ducha que se encuentra en el laboratorio.

12 Simbología:

ACN : acetonitrilo

BUF WASH (conc.): Concentrado de tampón de lavado

CAL : Calibrador

CONJ : Conjugado

CD : disco compacto

°C : grados Celsius

CV% : Coeficiente de variación porcentual

DCF : Departamento de Ciencias Forenses.

DOA I WB P: Drugs of Abuse I Whole Blood Plus (Drogas I Sangre Entera Plus)

DIL ASY: Diluyente de análisis

DIL SPE: Diluyente de muestras

DISP FL conc: Concentrado de fluido de desplazamiento

LUM-EV841: Luminol-EV841

min : minutos

mL : mililitros

N/A : No aplica.

PON : Procedimiento de Operación Normado.

PX : Peróxido

r : coeficiente de correlación de la curva de calibración

Rpm : revoluciones por minuto

SCD : Solicitud de cambio documental.

SD : desviación estándar

SGC : Sistema de Gestión de la Calidad.

UGC : Unidad de Gestión de la Calidad.

µl : microlitro

13 Terminología:

Blanco de matriz: matriz de sangre, músculo rojo o hígado libre de drogas o medicamentos, a las que se les aplica el mismo proceso que a las muestras. Corresponde a un control negativo.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 19 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

Muestra incógnita: muestra de sangre, hígado o músculo rojo que se desea analizar por RANDOX.

14 Anexos

No. de Anexo	Nombre del Anexo
1	Preparación de reactivos
2	Esquema de trabajo: Determinación de drogas de abuso y medicamentos en matrices biológicas por inmunoensayo (BIOCHIPS RANDOX)
3	Protocolo de análisis y fundamento

COPIA NO CONTROLADA

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 20 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

ANEXO No. 1

Preparación de reactivos

Agua jabonosa:

1. Agregue agua de grifo a una cubeta de plástico o metal, luego agregue aproximadamente media taza de jabón alcalino comercial y agite manualmente. Prepare cada vez que se utiliza. Algunos jabones líquidos según la casa comercial necesitan una dilución previa a su uso para eso refiérase a las instrucciones de preparación según la marca del jabón.

Buffer de lavado (BUF WASH) en Evidence Investigator:

1. El tampón de lavado se suministra concentrado, por lo que es necesario diluirlo antes del uso. El factor de dilución es 31,25, es decir, añada 32 ml de concentrado a 968 ml de agua. Mezcle por inversión.
2. El tampón de lavado diluido es estable durante 30 días en refrigeración.

Buffer de lavado (BUF WASH) en RANDOX Evidence:

1. El tampón de lavado se suministra concentrado, por lo que es necesario diluirlo antes del uso. Añada 320 ml de concentrado a 10 L de agua. Mezcle agitando suavemente, evitando la formación de burbujas.
2. El tampón de lavado diluido es estable durante 30 días en refrigeración.

Disolución de cloro al 0,5%:

1. Verifique en la etiqueta de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente la concentración de esta.
2. Determine el volumen que necesita de la disolución de cloro concentrada para preparar el volumen requerido de la disolución de cloro al 0,5%, utilizando la siguiente formula:

$$(Cd) \times (Vd) = (Cc) \times (V)$$

$$\text{despejando se obtiene: } (V) = (Cd) \times (Vd) / (Cc)$$

donde:

(CD): Concentración deseada, 0,5%.

(Vd): Volumen requerido de la disolución de la concentración deseada a preparar.

(Cc): Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente

(V)= Volumen en mililitros de la disolución de cloro concentrada que se adquiere comercialmente de concentración conocida.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 21 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)	P-DCF-ECT-TOX-039	

- Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de la disolución de cloro concentrada adquirida comercialmente (V) al recipiente que va a contener la disolución de cloro al 0,5% (ejemplo: el recipiente puede ser una pizeta de 500mL, Vd= 500 mL).
- Utilizando una probeta adecuada al volumen a medir, adicione el volumen de agua destilada o desionizada necesario para completar el volumen de la disolución de cloro al 0,5% deseado.
- Agite suavemente por inversión manual. Identifique el recipiente que va a contener la disolución preparada como "Disolución de cloro al 0,5%" y rotule con la fecha de preparación e iniciales de quién la prepara.
- Almacene a temperatura ambiente. Esta disolución es estable al menos por 1 mes. Ejemplo: en el siguiente cuadro se presentan ejemplos de algunos volúmenes y concentraciones utilizadas en la preparación de una disolución de cloro al 0,5%:

Concentración deseada (Cd:%)	Volumen de la disolución de la concentración deseada (Vd:mL)	Concentración conocida de la disolución de cloro concentrada (Cc:%)	Volumen de la disolución de cloro concentrada, se adquiere comercialmente (V:mL)	Volumen necesario a agregar de agua destilada o desionizada para completar el volumen de la disolución de cloro deseada (mL)
0,5	500	12	21	480
0,5	1000	12	42	960
0,5	500	10	25	475
0,5	1000	10	50	950

Diluyente de análisis (DOA I WB P DIL ASY), Solución de conjugado (DOA I WB P CONJ), Biochips (DOA I WB P BIOCHIPS) y Diluyente de muestras (DOA I WB P DIL SPE), Luminol-EV841 (LUM-EV841) y Peróxido (PX):

- Estos reactivos son provistos por la casa comercial en los kits de análisis
- Están listos para su uso y permanecen estables hasta la fecha de caducidad si se almacena en refrigeración. Tanto el diluyente de análisis y solución de conjugado pueden permanecer dentro del equipo si este está encendido ya que el mismo cuenta con refrigeración en la zona de reactivos.
- Los reactivos de señal permanecen estables 24 horas dentro del equipo, una vez fuera del mismo se deben de guardar en refrigeración.
- Los biochips tienen una estabilidad de 7 días a temperatura ambiente (sellado con cinta adhesiva y con desecante)

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 22 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

3.5.1.1 Kit de prueba:

Componente del kit	Preparación
Diluyente de ensayo	Listo para usar líquido
Conjugado multianalitos	Listo para usar o líquido concentrado o liofilizado.
Biochips	Listo para usar. Retirar del embalaje exterior.
Calibradores	Listo para usar líquido o liofilizado
luminol / Potenciador del luminol + peróxido	Listo para usar líquido Mezclar (1:1) y agitar muy suavemente durante 15 minutos antes de usar. Estable durante 4 horas @ 2 - 8°C.
Tampón de lavado	Prepare la cantidad necesaria de tampón de lavado para la fuerza de trabajo, p. ej. para un litro añada 32 ml de concentrado de tampón del lavado en 968 ml de agua doblemente desionizada.

**Agua DD - Agua doblemente desionizada

DISP FL conc: Concentrado de fluido de desplazamiento en RANDOX Evidence:

1. El concentrado de fluido de desplazamiento se suministra concentrado, por lo que es necesario diluirlo antes del uso. Añada 500 ml de L concentrado a 10 L de agua. Mezcle agitando suavemente, evitando la formación de burbujas.
2. El fluido de desplazamiento diluido es estable durante 48 horas a temperatura ambiente.

Acetonitrilo con 1 % de ácido acético.

Mida 990 mL de acetonitrilo p.a.r. con una probeta de 1 L y deposite en una botella de vidrio de 1 L.

Mida 10 mL de ácido acético glacial con probeta de 10 mL y deposítelos en la misma botella. Coloque un dispensador de disoluciones de 1-10 mL en la botella.

Rotule la botella. La recomendación de su estabilidad es de 6 meses después de preparada.

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 23 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

ANEXO No. 2

Esquema de trabajo: Determinación de drogas de abuso y medicamentos en matrices biológicas por inmunoensayo (BIOCHIPS RANDOX)

	ORGANISMO DE INVESTIGACION JUDICIAL DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES SECCION DE TOXICOLOGIA FORENSE
	ESQUEMA DE TRABAJO: DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)

Fecha: _____ RAS: _____
 Analista: _____

Tipo de kit: DOA WB Plus	Lote	Fecha de expiración
Juego de reactivos (Kit)		
Biochip		
Diluyente de muestras (DIL SPE)		
Diluyente de análisis (DIL ASY)		
Conjugado		
Peroxido		
Luminol		
Buffer lavado concentrado		

	Lote	Fecha de preparación	Encargado de preparación	Fecha expiración
Calibradores				
Control 1				
Control 2				
Control negativo				

	Fecha de preparación	Hora de preparación
Reactivo indicador		

Nota: El reactivo indicador es una mezcla 1:1 de peroxido y luminol. Es estable por 4 horas.

	Fecha de preparación	Fecha de expiración
Buffer de lavado		

Nota: el buffer de lavado puede prepararse en una pizeta agregando 16mL de buffer de lavado concentrado y 484 mL de agua desionizada.

P-DCF-C Emitido y

DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)

P-DCF-ECT-TOX-039

Ctl negativo	Ctl positivo N1	Ctl positivo N2	M # 7	M # 8	M # 9
M # 1	M # 2	M # 3	M # 10	M # 11	M # 12
M # 4	M # 5	M # 6	M # 13	M # 14	M # 15
M # 16	M # 17	M # 18	M # 25	M # 26	M # 27
M # 19	M # 20	M # 21	M # 28	M # 29	M # 30
M # 22	M # 23	M # 24	M # 31	M # 32	M # 33
M # 34	M # 35	M # 36	M # 43	M # 44	M # 45
M # 37	M # 38	M # 39	M # 46	M # 47	M # 48
M # 40	M # 41	M # 42	M # 49	M # 50	M # 51

DEPARTAMENTO DE CIENCIAS FORENSES	VERSIÓN 08	PAGINA: 25 de 25
DETERMINACIÓN DE DROGAS DE ABUSO Y MEDICAMENTOS EN MATRICES BIOLÓGICAS POR INMUNOENSAYO (BIOCHIPS RANDOX)		P-DCF-ECT-TOX-039

ANEXO No. 3

Protocolo de análisis y fundamento

Esta tecnología consiste en dispositivos de estado sólido que contienen una matriz de zonas de análisis separadas con anticuerpos inmovilizados específicos para diferentes clases de drogas. Para los ensayos de drogas se utiliza un inmunoanálisis competitivo por quimioluminiscencia, donde las muestras con drogas de abuso y la droga de abuso marcada con peroxidasa de rábano (HRP), compiten entre sí directamente por los sitios de unión al anticuerpo. Los niveles mayores de droga en una muestra conducen a reducción de la unión de la droga marcada con HRP y, por tanto, se observará una reducción de la señal quimioluminiscente emitida.

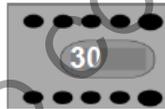
La señal lumínica generada en cada una de las zonas de análisis del biochip se detecta mediante tecnología de imagen digital y se compara con la de una curva de calibración almacenada. La concentración del analito presente en la muestra se calcula a partir de la curva de calibración.

— evidence —
INVESTIGATOR

Método de análisis para la Matriz DOA I WB P



1. Añada 120 µl de tampón de análisis, 60 µl de muestra diluida (o estándar) y 120 µl de conjugado a cada pocillo.



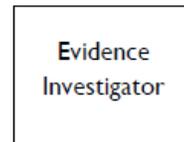
2. Incube el soporte de biochips a +25 °C durante 30 minutos a 330 rpm en el termoagitador.



3. Decante el líquido y lave cada pocillo. Realice 6 lavados rápidos y empape 6 veces durante 2 minutos. Decante el líquido y golpee la bandeja sobre papel limpio sin pelusa.



4. Mezcle luminol-EV841 y peróxido (1:1). Añada 250 µl de reactivo indicador EV841 a cada pocillo de reacción. Incube durante 2 minutos protegiendo la bandeja de la luz.



5. Analice por imagen cada soporte en el Sistema Investigator.