
 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 Departamento Bioquímico Laboratorio de Salud Pública	Procesamiento de suero y LCR por IDD	Código: PRO.DB-LSP.MI.I30
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 3/6/19
			Versión: 00

OBJETIVO del presente instructivo es de normatizar, instruir, estandarizar, y establecer la forma de realizar la técnica de serología en la DM-LSP.

ALCANCE: personal del Servicio de Micología del Laboratorio de Salud Pública de Tucumán.

REGISTROS:

PRO.DB-LSP.MI.M05. Manual de Medios Cultivo V00

DEFINICIONES Y ABREVIATURAS:

IDD: inmunodifusión doble

RESPONSABILIDADES

Bioquímicos y/o técnicos capacitados para realizar esta técnica.

DESARROLLO

Esta técnica permite detectar anticuerpos.

PROCEDIMIENTO:

1- Materiales necesarios:

- Agar para inmunodifusión. (Ver PRO.DB-LSP.MI.M05. Manual de Medios Cultivo V00).
- Suero del paciente y suero control de referencia
- Antígenos estandarizados
- Placa de Petri de plástico de 15 x 100
- Perforador metálico de 4 mm de diámetro.
- Pipeta automática P20
- Cámara húmeda
- Heladera

2- Preparación de las placas para IDD:

Fundir el agar fenolizado a baño María que se encuentra fraccionado en tubos de hemólisis con tapa en la heladera con la cantidad justa para ser agregado a cada placa. Dejar enfriar a 60 - 65 °C. y verter el contenido del tubo en cada placa en las siguientes cantidades:

- Placas de plástico de 50 X 12 mm= 3,0 mL de agar
- Placas de plástico de 100 X 15 mm= 10 mL de agar

Nota: el grosor de las placas de agar deben oscilar entre 1,2 a 1,6 mm. Si el gel es demasiado delgado las líneas son tenues y confusas y si es muy grueso (2 mm o más) el número de bandas inespecíficas o dudosas aumenta porque no se puede lavar bien.

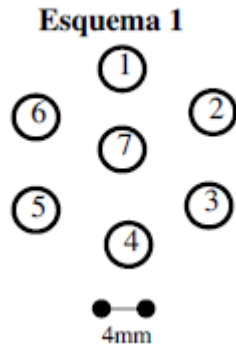
Las placas deben apoyarse sobre una superficie plana para que el espesor sea uniforme.

Dejar solidificar sin mover la placa y colocar a 4 °C por lo menos una hora antes de hacer los pocillos o si es posible prepararlas el día anterior. Estas placas se pueden conservar durante un mes a 4°C

3- Ejecución de la prueba:

- Sacar las placas de la heladera
- Cortar el gel con los perforadores de metal de 4 mm de diámetro según esquema

Elaboración	Revisión	Aprobación
Sofía Colombres	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Bioquímica del SM-LSP	Jefe de División Micología - LSP	Dirección



LARGADA

- Cargar los pocillos con aproximadamente 20 µl de reactivo, mediante el uso de micropipeta, de manera que los bordes no se distinguan. Evitar derramar y sobrecargar.
- Con una micropipeta colocar el antígeno específico en el pocillo central.
- En el pocillo 1 cargar el anticuerpo específico (la precipitación de una banda con el antígeno valida la prueba)
- Llenar los pocillos 2, 3, 4, 5 y 6 con los sueros que requieran identidad
- Colocar la placa en cámara húmeda a temperatura ambiente.
- Leer a los tres días quitando la tapa de las placas de Petri para poder visualizar las bandas de precipitación antígeno- anticuerpo.

LAVADO

- Lavar con citrato de sodio al 5% durante 90 minutos y descartar
- Lavar con solución fisiológica 90 minutos y descartar
- Lavar con agua destilada 10 minutos y descartar
- Colocar un papel de filtro en cada placa, de manera que quede adherido al gel
- Cubrir con agua destilada (10 mL) y colocar en estufa de cultivo a 37°C durante 18-24 horas.

COLORACIÓN



- Realizar la misma trascurrido el tiempo de lavado siguiendo las instrucciones del PRO.DB-LSP.MI.I17-Técnica de coloraciones V01- en campana de extracción de gases

LECTURA

Leer y anotar los resultados definitivos entre los sueros del paciente y los de referencia como:

- Reacción de identidad
- Reacción de no identidad
- Identidad parcial.

Elaboración	Revisión	Aprobación
Sofía Colombres	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Bioquímica del SM-LSP	Jefe de División Micología - LSP	Dirección

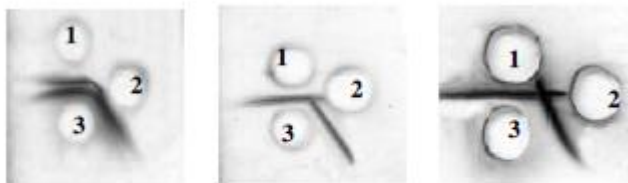
 MINISTERIO DE SALUD PÚBLICA	 Departamento Bioquímico Laboratorio de Salud Pública	Procesamiento de suero y LCR por IDD	Código: PRO.DB-LSP.MI.I30
			Vigencia: 2/2/16
			Revisión: 3/6/19
			Versión: 00

4- Interpretación de los resultados

Las reacciones de precipitación en gel de agar pueden ser de tres tipos:

- Reacción de identidad
- Reacción de no identidad
- Identidad parcial

Las líneas de precipitación específica (antígeno- suero control), se utilizan como patrones de referencia en cada prueba. La aparición de una o más bandas de identidad por la interacción del suero del paciente con el antígeno constituye una reacción positiva.



Pocillo 1: suero control positivo, Pocillo 2: suero de pacientes, Pocillo 3: antígeno.

Los sueros que dan bandas de precipitación, pero no dan identidad con el suero control (línea específica de referencia) deben considerarse sospechosos y requieren nuevos estudios.

La prueba de IDD es positiva durante todo el proceso patológico y de una de las pruebas más recomendables para el diagnóstico en caso de NO poder realizar cultivo. La limitante es que los pacientes deben ser inmunocompetentes.

Elaboración	Revisión	Aprobación
Sofía Colombres	Christian Alvarez	Gabriela Alcaraz
Bioquímica del SM-LSP	Jefe de División Micología - LSP	Dirección