

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS Y CONTROL DE CALIDAD EN INMUNOSEROLOGIA PARA CENTROS DE HEMOTERAPIA Y BANCOS DE SANGRE

INDICE

1. Introducción	3
2. Finalidad.....	3
3. Objetivos.....	3
4. Base Legal	4
5. Ámbito de Aplicación.....	4
6. Condiciones de Bioseguridad.....	4
CAPITULO I	
Procedimientos de las Pruebas en Inmunoserología de las Infecciones	
Hemotransmisibles.....	5
1. Aspectos Generales de los Principales Agentes Hemotransmisibles a Tamizar.....	5
1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH).....	5
1.2 Virus Linfotrópico de las Células T Humano (HTLV I /II).....	6
1.3 Hepatitis Virales.....	6
1.3.1 Virus de Hepatitis B (VHB).....	7
1.3.2 Virus de Hepatitis C (VHC).....	8
1.4 Trypanosoma Cuzi (Enfermedad de Chagas).....	8
1.5 Treponema Pallidum (Sífilis).....	9
2. Métodos serológicos para tamizaje	10
2.1 Técnica ELISA.....	10
2.2 Técnica de RPR.....	16
CAPITULO II	
Control de Calidad Interno en Inmunoserología para Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre.....	
2. Control de Calidad.....	19
2.1 Procedimientos generales.....	19
2.2 Fuentes de variación.....	20
2.3 Evaluación de los métodos serológicos.....	21
2.3.1 Indicadores del valor de las pruebas de tamizaje.....	21
2.4 Estudio estadístico de los datos serológicos.....	23
2.5 Monitoreo de los procesos serológicos del tamizaje.....	23
2.5.1 Control Interno.....	24

2.5.2	Gráficas de control.....	24
2.5.3	Uso de suero control externo.....	24
2.5.4	Interpretación de la gráfica de control de Levey Jennings.....	26
2.5.5	Reglas múltiples de Sheward.....	26
2.6	Control de calidad de la prueba ELISA.....	27
2.7	Control de calidad del RPR.....	28
3	Mantenimiento y calibración de equipos.....	30
3.1	Analizador de ELISA.....	30
3.2	Lavador de microplacas ELISA.....	30
3.3	Equipo automatizado.....	31
3.4	Incubadora.....	31
3.5	Rotador serológico.....	31
3.6	Micropipetas.....	31
	ANEXOS.....	34
	Anexo A HIV y HTLV.....	34
	Anexo B HBs Ag y Anti-HBc	35
	Anexo C HVC	36
	Anexo D Sífilis	37
	Anexo E Enfermedad de Chagas.....	38
	Anexo F Protocolo de trabajo ELISA	39
	Anexo G Protocolo de trabajo RPR	40
7.	Responsabilidad.....	42
8.	Abreviaturas.....	42
9.	Glosario de términos.....	43
10.	Bibliografía	47

1.- INTRODUCCION

El control de la transmisión de las enfermedades infecciosas hemotransmisibles es un reto no sólo para quienes desarrollan sus actividades en el campo de la medicina transfusional, sino también para quienes se encuentran comprometidos en la salud pública de un país.

Según lo establece el Art. 6° de la Ley N° 26454, que declaró de Orden público e interés nacional ... , “Los Bancos de Sangre son establecimientos destinados a la extracción de sangre humana, para transfusiones, terapias preventivas y a investigación; funcionan con licencia sanitaria y están encargados de asegurar la calidad de esta y sus componentes durante la obtención, procesamiento y almacenamiento”; y el Art. 7° especifica: “Los Bancos de Sangre deben realizar obligatoriamente las pruebas correspondientes para la sangre y sus componentes, según las normas internacionales de la Organización Mundial de la Salud vigentes”; al amparo de éste marco legal, el Programa Nacional de Hemoterapia y Bancos de Sangre estableció la obligatoriedad del tamizaje de todas las unidades de sanguíneas con los siete marcadores serológicos que en la actualidad ejecutan los servicios transfusionales del nivel nacional: Sífilis, Hepatitis B (Antígeno de superficie y Core), Hepatitis C, VIH 1-2, HTLV I – II (virus linfotrópicos de células T humanas) y, Chagas.

El presente manual de procedimientos y control de calidad en inmunoserología para Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre se constituye en una herramienta que permitirá orientar al personal, sobre las técnicas y procedimientos adecuados que permitan garantizar la confiabilidad de los resultados, uniformizando los criterios para su interpretación y validación.

Todos los esfuerzos para disminuir esta forma de transmisión serán infructuosos si no se asume el compromiso de actualizar y fortalecer los procesos de tamizajes inmunoserológicos que los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre por parte del nivel operativo y gerencial; así como de implementar en éste servicio en un Programa de Control de Calidad Interno y participar en un Programa de Evaluación Externa del Desempeño en Inmunoserología, como requisitos contemplados en el Sistema de Gestión de la Calidad del PRONAHEBAS.

2.- FINALIDAD

Estandarizar los procesos y procedimientos de inmunoserología y control de calidad que se desarrollan en los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre del nivel nacional.

3.- OBJETIVOS

1. Difundir los procedimientos técnicos estandarizados para las pruebas de Inmunoserología en los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre en el tamizaje de las unidades de sangre; 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.
4. Fortalecer la seguridad sanguínea en los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre a nivel nacional.

4.- BASE LEGAL

- Ley N° 26842, Ley General de Salud.
- Ley N° 27657, Ley del Ministerio de Salud.
- Ley N° 26454, Ley que declaró de orden público e interés nacional la obtención, donación, conservación, transfusión y suministro de sangre humana.
- Decreto Supremo N° 013-2002-SA, Reglamento de la Ley del Ministerio de Salud.
- Decreto Supremo N° 03-95-SA, Reglamento de la Ley N° 26454.
- Resolución Ministerial N° 283-99-SA-DM, establecen normas de procedimientos para control, medidas de seguridad y sanciones en relación con la obtención, donación, conservación, transfusión y suministro de sangre humana.
- Resolución Ministerial N° 753-2004-MINSA, aprueban “Norma Técnica de Prevención y Control de Infecciones Intrahospitalarias”.
- Resolución Ministerial N° 826-2005/MINSA, aprueban “Normas para la elaboración de documentos normativos del Ministerio de Salud”
- Resolución Ministerial N° 614-2004/MINSA que aprueba las Normas Técnicas del Sistema de Gestión de la calidad del PRONAHEBAS

5.- AMBITO DE APLICACION

El presente manual es de aplicación en todos los establecimientos de salud del Sector Salud.

6.- CONDICIONES DE BIOSEGURIDAD

El personal del laboratorio de inmunoserología debe realizar el tamizaje cumpliendo con las normas descritas en el Manual Bioseguridad para Bancos de Sangre del PRONAHEBAS.

CAPITULO I

PROCEDIMIENTOS DE LAS PRUEBAS EN INMUNOSEROLOGÍA DE LAS INFECCIONES HEMOTRANSMISIBLES

1. ASPECTOS GENERALES DE LOS PRINCIPALES AGENTES HEMOTRANSMISIBLES A TAMIZAR

1.1 Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

Los virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1 y VIH-2) son retrovirus ARN con envoltura, se transmiten por vía sexual, sanguínea y perinatal, primariamente infectan a los linfocitos.

La situación del VIH / SIDA en el Perú de acuerdo a datos consignados en el Boletín Epidemiológico Mensual de la Oficina General de Epidemiología de Enero del 2006, durante el periodo 1983 – 2005, se reporto: 18,059 casos de SIDA, 24,449 casos de VIH notificados al 31 de Enero del 2006

El tamizaje para VIH tiene por objetivo la detección de anticuerpos y/o antígenos de este virus en el donante. A pesar que las pruebas de tamizaje son muy sensibles, la ausencia de anticuerpos contra el virus no descarta totalmente la infección ya que durante la primera infección, existe replicación viral sin que haya una expresión serológica de los anticuerpos contra el VIH. Esta etapa denominada “período ventana” puede prolongarse por varias semanas.

Las pruebas de tamizaje con resultados reactivos indican la probabilidad de que la sangre esté infectada. Toda muestra reactiva debe repetirse por lo menos una vez con la misma prueba de tamizaje.

Aunque las pruebas utilizadas para detectar los anticuerpos anti-VIH son sumamente sensibles, específicas y reproducibles, se debe requerir que las pruebas de tamizaje tengan una sensibilidad 100% y por lo menos, un 97% de especificidad.

La prueba de tamizaje mas utilizada en los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre para la detección de anticuerpos y/o antígeno anti-VIH es la técnica ELISA. Las primeras pruebas desarrolladas utilizaron lisados virales (antígenos utilizados en estas pruebas se prepararon a partir de viriones del VIH). Estas técnicas son conocidas como ELISA de primera generación las cuales tienen alta sensibilidad pero poca especificidad.

Posteriormente se desarrollaron las ELISA de segunda generación las cuales utilizaron antígenos recombinantes preparados por ingeniería genética, luego las ELISA de tercera generación cuyos antígenos son péptidos sintéticos obtenidos por síntesis química y finalmente las ELISA de cuarta generación que además de detectar anticuerpos detecta el antígeno p24 del VIH-1 mediante la introducción de anticuerpos monoclonales en el soporte sólido.

1.2 Virus Linfotrópico de las Células T Humano (HTLV I/II)

El virus de tipo I linfotrópico para la célula T (HTLV-I) esta relacionada con el desarrollo de leucemias/linfomas y de mielopatía crónica progresiva o paraparesia tropical espástica. Los casos de infección con HTLV-I en América Latina, no siempre se observan acompañados por síntomas clínicos. Las formas de transmisión son los mismos que para el VIH, o sea sexual, sanguínea y perinatal.

En el Perú la infección por HTLV-1 afecta particularmente a ciertas etnias y a grupos que constituyen poblaciones de riesgo para enfermedades de transmisión sexual. En un estudio peruano de mujeres asintomáticas se notificaron tasas de 1.3% en la población quechua de Ayacucho y de 3.8% tanto en la zona norte de Lima como Chíncha en los que predominan los pobladores mestizos y con ascendientes de raza negra respectivamente. En población Aymara 1.8% y en personas nativas de la selva 0.9%, 16% de la primera generación de inmigrantes japoneses en el Perú es seropositiva a HTLV-1, a nivel de gestantes asintomáticas de Quillabamba se reporta 2.3% de HTLV-1.

En trabajadoras sexuales peruanas, en hombre con actividad homosexual y en hombres drogadictos no endovenoso fluctúa entre 2 y 25%, en hombres peruanos VIH positivos una prevalencia de HTLV-1 de 18.6%.

La transmisión madre-niño ocurre principalmente a través de la lactancia materna y de los diferentes trabajos realizados fluctúa entre 5.7 y 37.5%.

El riesgo de transmisión de HTLV-1 a través de sangre completa contaminada se ha estimado entre 50 y 60%, el riesgo disminuye cuando la sangre se mantiene almacenada más de una semana.

El tamizaje debe ser realizado a través de técnicas de ELISA. Los ensayos que emplean lisados virales o proteínas recombinantes presentan un **índice alto de inespecificidad y reacción cruzada** con el HTLV-II.

Los reactivos que emplean péptidos sintéticos específicos permiten diferenciar las infecciones por HTLV-1 de las de HTLV-2 como es el caso de las pruebas confirmatorias para este diagnóstico.

1.3 Hepatitis Virales

Se han descrito cinco virus denominados con las primeras letras del alfabeto A, B, C, D, E, los cuales son capaces de producir una infección selectiva en células hepáticas humanas.

Virus	Familia	Genoma	Tamaño	Período de incubación	Vía de Transmisión	Cronicidad	Marcador de tamizaje en Centro de Hemoterapia y Banco de Sangre
VHA	Picornavirus	RNA	27	4 sem	Fecal-oral	No	No
VHB	Hepadnavirus	DNA	42	1-6 sem	Parenteral, sexual, vertical	Si	HBsAg. Anti-HBC
VHC	Flavivirus	RNA	<60	1-5 sem	Parenteral, sexual, vertical	Si	Anti-VHC
VHD	Satélite animal	RNA	22	2-6 sem	Parenteral	Si	No
VHE	Calicivirus	RNA	32-34	6 sem	Fecal-oral	no	No

Las infecciones determinadas por los virus de la hepatitis B (VHB), C (VHC) pueden ser inaparentes o sintomáticas y a su vez, estas pueden evolucionar en forma aguda o crónica. Muy raramente las formas agudas evolucionan de modo fulminante con alta letalidad. En el VHB la evolución hacia la cronicidad se correlaciona con el estado del portador de antígeno de superficie del agente. A su vez el estado del portador depende de la edad de la infección variando desde el 90% en los niños de madres portadoras de antígeno e (HBeAg), hasta el 5-10 % en adultos. Se estima que el 50% de las infecciones por el VHC evolucione hacia la cronicidad.

Las hepatopatías crónicas asociadas con el VHB y el VHC consisten en hepatitis crónica persistente o activa; estas pueden progresar hasta tornarse en una cirrosis o un carcinoma hepatocelular. También se ha descrito la asociación del VHC con las hepatitis auto inmune.

1.3.1 Virus de la Hepatitis B (VHB)

Los estudios serológicos realizados en donantes de sangre, permiten estimar la existencia de casi 10 millones de portadores de VHB en América latina existe una alta endemicidad en la región Amazónica Occidental, así como áreas de Venezuela, Colombia, Perú y Republica Dominicana. El Perú un país con una población de 27'219,264. de habitantes, se tiene un promedio de prevalencia entre 1 a 2% para antígeno de superficie (HBsAg) y de 20-30% para anticuerpos contra HBcore del virus de la Hepatitis B (VHB). La prevalencia de la hepatitis B varía de acuerdo a las diferentes regiones geográficas, localidades, hábitat y los grupos de población distribuidas en las diversas áreas geográficas, presenta zonas hiperendémicas en la región de la selva alta que incluye a 10 departamentos que cuentan con selva alta y áreas rurales de la selva baja. Además en algunos valles de la vertiente oriental de la cordillera de los Andes como Abancay y Huanta.

HBsAg: Antígeno de superficie del virus B. Aparece en el suero al final del periodo de incubación de la hepatitis B, en la fase aguda y en el estadio crónico. Durante la infección aguda, si esta evoluciona favorablemente desaparece entre el 2º y 4º mes. Si se detecta mas allá de los 6 meses indica paso a la cronicidad. Es un marcador muy útil para detectar portadores crónicos.

Anti-HBc: Anticuerpos totales frente al core. Es el primer anticuerpo que aparece y el que más tiempo permanece durante años. Se detecta en todas las fases: Infección aguda, convalecencia, crónica y de remisión.

1.3.2 Virus de Hepatitis C (VHC)

El virus se contagia fundamentalmente a través de la sangre, pocas veces por relaciones sexuales y excepcionalmente de madre a hijo. Muchos casos de hepatitis C se diagnostican en pacientes sin síntomas que no recuerdan haber pasado una hepatitis aguda. A veces el diagnóstico se hace cuando los pacientes van a donar sangre o si se realizan análisis de rutina. En América Latina la prevalencia del VHC en donantes de sangre varía de 0.1% al 2%, dependiendo de las regiones estudiadas, en el Perú en el año 2001 se tuvo un promedio de 0.60%, 0.89% en la Selva, 0.60% en la Costa y 0.46% en la Sierra en donantes de sangre.

Las pruebas serológicas en bancos de sangre están basadas en la detección de anticuerpo contra el VHC por técnicas ELISA, específicamente contra antígenos estructurales y no estructurales del virus. En la actualidad, los ELISA utilizan una mezcla de antígenos derivados de la región core y de las regiones NS3, NS4 y, frecuentemente, NS5 del genoma del VHC. Históricamente los primeros métodos, llamados “de primera generación”, contenían exclusivamente epítopes de la proteína NS4. Posteriormente se mejoraron con la incorporación de epítopes de las proteínas core y NS3, denominándose por ello “de segunda generación”. Este cambio supuso un aumento considerable de la sensibilidad, aunque no introdujo una mejora objetiva de la especificidad. Las modificaciones posteriores que dieron origen a los llamados métodos de “tercera generación”, consistieron en la incorporación de epítopes de la proteína NS5 y en el uso de mezclas de antígenos recombinantes junto con péptidos sintéticos para mejorar la especificidad. La sensibilidad comparativa de los distintos métodos suelen venir definida por su capacidad para detectar anticuerpos frente a la proteína NS3 (anti NS3), especialmente cuando se trata de detectar estadios precoces de la seroconversión.

1.4 Trypanosoma Cruzi (Enfermedad de Chagas)

El parásito *Trypanosoma cruzi* es el agente causal de la enfermedad de Chagas ó Tripanosomiosis Americana y es transmitida al ser humano por insectos hematófagos, conocidos como triatominos. La enfermedad afecta diversos órganos, sistemas y aparatos, especialmente el corazón y tubo digestivo.

Durante los 3 primeros meses y esporádicamente en el transcurso de la infección el parásito se encuentra circulando en el torrente sanguíneo por lo que también se puede contraer la infección al recibir sangre infectada con *Trypanosoma cruzi*.

Se estima que en el Perú existen 24,170 infectados por *Trypanosoma cruzi*, de los cuales 1,209 corresponden a formas agudas u oligosintomáticas y 22,962 a formas crónicas de la enfermedad. La infección por sexo es equitativa y el grupo de edad más afectado está entre los 20 a 50 años. (MINSA/OGE-1998). La seroprevalencia de la infección en áreas de riesgo oscila entre 1,3% y 12%, en donantes de sangre a nivel nacional entre 0.14% y 0.5%. En el 2005 el porcentaje de unidades que resultaron reactivas en el tamizaje para Chagas alcanzó el 0.57%. (PRONAHEBAS).

El ensayo Inmunoenzimático ELISA, es la técnica de elección para realizar el tamizaje de la infección, por presentar la mayor sensibilidad y tener la capacidad de detectar anticuerpo anti - *Trypanosoma cruzi* después de los 20 días de ocurrida la infección . Así mismo puede evaluar mayor número de sueros por corrida.

La sensibilidad y especificidad de la técnica está en función de la calidad del antígeno, los extractos antigénicos totales del parásito muestran una alta sensibilidad; y los recombinantes y péptidos sintéticos, buena especificidad.

1.5 Treponema Pallidum (Sífilis)

La Sífilis, llamada también chancro duro, enfermedad de Lues, es una infección producida por *Treponema pallidum* sub especie *pallidum*, bacteria en forma espirilada, ampliamente distribuida en el mundo. En los Estados Unidos, en el año 2002, se registraron 32,000 casos de sífilis, de los cuales 6,862 eran casos de sífilis primaria y secundaria, asimismo, se reportaron 412 casos de sífilis congénita (fuente), El PRONAHEBAS, para el año 2005 reporto reactividad en 1.30 %

El hombre es el único huésped para esta bacteria la cual produce lesiones ulcerativas indoloras de evolución crónica, la infección suele presentarse en 3 fases definidas: primaria, secundaria y terciaria, sin embargo puede aparecer un periodo de latencia (sífilis latente) pudiendo ésta ser temprana o tardía dependiendo del tiempo en que aparecen las lesiones.

La principal vía de transmisión de esta enfermedad es la sexual, puede haber otras formas de transmisión: madre - niño, transfusión sanguínea, manipulación de lesiones sifilíticas y todo tipo de muestras biológicas de pacientes sifilíticos.

El tamizaje para sífilis se realiza mediante pruebas serológicas, utilizándose antígenos no treponémicos (RPR, USR).

Las pruebas de ELISA son pruebas treponémicas utilizadas en Centros de Hemoterapia y Bancos de sangre donde existe gran demanda de muestras por día, por lo que estas pruebas son procesadas por equipos automatizados

2. MÉTODOS SEROLÓGICOS PARA TAMIZAJE

2.1 Técnica ELISA

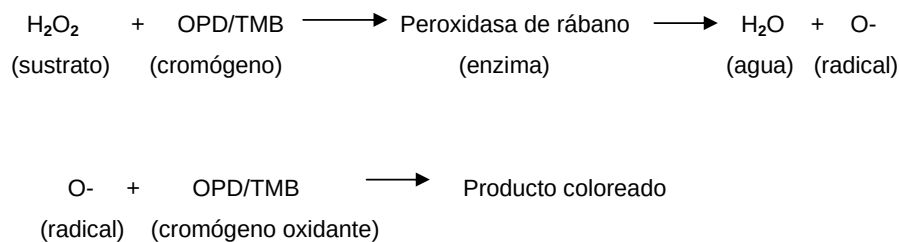
Es una de las pruebas serológicas más utilizadas en el tamizaje de las unidades de sangre en los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre.

ELISA (Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay) es una técnica sensible que nos permite detectar antígenos o anticuerpos en fluidos biológicos. Este inmunoensayo involucra la fijación de antígeno o anticuerpos sobre una fase sólida.

En ambos casos se formará el complejo antígeno-anticuerpo, el cual será unido por una anti-inmunoglobulina marcada inmunoenzimáticamente.

Las enzimas son fosfatasa alcalina o peroxidasa, estas enzimas son capaces de modificar un sustrato en presencia de un cromógeno (componente productor de color) produciendo un producto coloreado que puede ser medido utilizando un espectrofotómetro (lector de ELISA), es directamente o inversamente proporcional a la concentración del antígeno o anticuerpo presente en la muestra, dependiendo del tipo de ELISA..

Una reacción típica enzima-sustrato puede ser la siguiente:



El exceso de reactantes en cada paso es eliminado con los sucesivos lavados.

El producto coloreado detectado por el espectrofotómetro debe ser medido en una específica longitud de onda lumínica en la que el color absorbe la luz incidente. Esto resulta en una señal que con el instrumento se convierte usualmente en unidades de densidad óptica (DO).

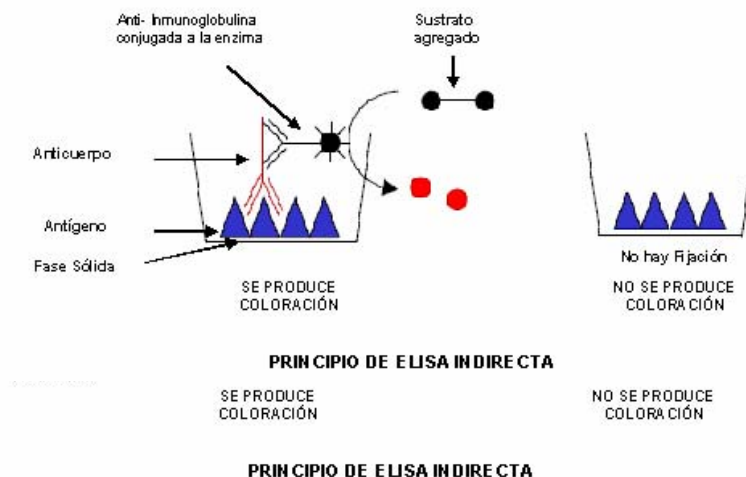
Existen una variedad de pruebas ELISA, las más utilizadas son:

ELISA Directo

Esta prueba es generalmente de tipo sándwich, con revelado enzimático, utilizando un anticuerpo monoclonal ligado a una fase sólida (pocillo, esfera plástica) el cual capta al antígeno presente en el suero. A continuación se agrega un anticuerpo policlonal marcado con una enzima (peroxidasa, fosfatasa alcalina) y se promueve el desarrollo de color tras la adición de sustrato cromogénico.

ELISA Indirecto

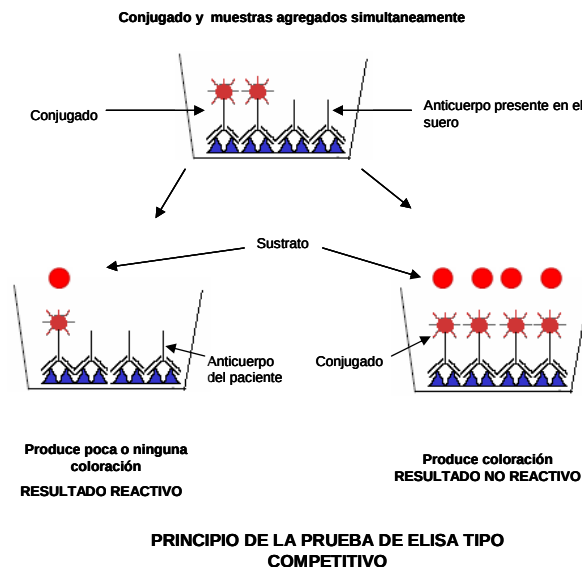
Se basa en la fijación de un antígeno en la fase sólida, el cual atrapa los anticuerpos de la muestra que posteriormente son identificados con un anticuerpo anti Inmunoglobulina humana específico marcado con una enzima. En estos casos la cantidad de Anticuerpo es directamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado, por lo cual se produce más color a medida que la concentración de anticuerpos aumenta en la muestra dando lecturas de DO altas, y viceversa.



ELISA Competitivo

Se basa en la competencia que se establece entre el anticuerpo de la muestra y el conjugado (que es un anticuerpo dirigido contra el antígeno) para ocupar sitios reactivos en el antígeno fijado. En este ELISA de tipo competitivo tanto la muestra que contiene el anticuerpo como el conjugado se agregan al mismo tiempo. Si la concentración de anticuerpos en la muestra es alta muy poco conjugado puede fijarse en los antígenos inmovilizados, por lo tanto habrá ausencia de coloración por la poca fijación de la enzima con el sustrato. Inversamente con muestras que contienen poco o nada de anticuerpos, más conjugado se fijará al antígeno y la posterior adición de sustrato producirá la presencia de color.

En estos casos la cantidad de anticuerpos en la muestra es inversamente proporcional a la cantidad de producto enzimático formado (producto coloreado).



ELISA de Captura de Antígeno

La prueba ELISA de captura puede ser de tipo indirecto o competitivo y solo difiere en la etapa inicial de fijación del antígeno en la fase sólida. Un anticuerpo monoclonal (anticuerpo muy específico dirigido sólo a un determinante antigénico) es fijado al soporte sólido para “capturar” a un antígeno específico. Esto tiende a disminuir la cantidad de sustancias contaminantes adheridas al soporte sólido resultando una menor fijación no específica. Estas pruebas son consideradas más específicas que las pruebas indirectas que incorporan proteínas totales del microorganismo.

Aunque las pruebas de ELISA utilizadas para detectar los anticuerpos son sumamente sensibles, específicas y reproducibles, ninguna es infalible; por lo tanto se requiere que las pruebas de tamizaje tengan una sensibilidad 100 % y no menor de 98% de especificidad.

Consideraciones generales previas al desarrollo de la Técnica

- a) Toda muestra de sangre debe ser considerada como material potencialmente infeccioso y seguir las medidas de bioseguridad establecidas en el Manual de Bioseguridad vigente.
- b) Las muestras a procesar no deben presentar hemólisis ni turbidez. Deben estar rotuladas con el código y fecha de obtención de muestra y ser conservadas en refrigeración (4°C), hasta su procesamiento.

- c) Utilizar kits con fecha de vencimiento vigente. No mezclar reactivos procedentes de diferentes lotes.
- d) Conservar los kits a temperaturas especificadas por el fabricante.
- e) Dejar que todos los reactivos alcancen la temperatura ambiental (18-25°C) antes de empezar el ensayo.
- f) Mezclar suavemente los reactivos líquidos antes de su uso.
- g) Diluir la solución de lavado concentrada según lo indicado por el fabricante, empleando agua destilada. Rotular el frasco con fecha de preparación y el kit al que pertenece. Debido a su alta concentración en algunos kits, pueden formar cristales por lo cual se debe homogenizar previamente a la dilución. El remanente de la solución diluida debe conservarse según las indicaciones del fabricante,
- h) Seguir estrictamente las instrucciones proporcionadas por el fabricante y descritas en el inserto del kit tanto para el procesamiento de las muestras como para analizar la validez. Incluir todos los sueros controles positivos, negativos, pocillo blanco indicados en el inserto.
- i) La validez del ensayo debe de hacerse de acuerdo a las indicaciones del kit más el suero control de calidad interno.
- j) Calcular el valor de corte y la zona indeterminada según indicaciones del kit. Todo kit debe indicar la zona gris o indeterminada
- k) Utilice protocolos de trabajo de acuerdo a la técnica a utilizar (ver Anexo F y G)
- l) Emplear equipos e instrumentos en buenas condiciones de operatividad con mantenimiento preventivo y calibrados (incubadora, potenciómetro, lector ELISA, lavador de placas, micropipetas, termómetro ambiental).
- m) Seguir los instructivos de uso de cada equipo, chequear los filtros del lector ELISA antes de iniciar los ensayos y llevar el registro de tiempo de uso.
- n) Preparar los protocolos de trabajo o mapas de distribución de muestras que serán procesadas.
- o) Realizar y registrar el control diario de la temperatura ambiental del laboratorio y de los siguientes equipos: Refrigerador donde se conservan los kits, incubadora empleada para los pasos de incubación 37 °C y congeladora donde se conservan los sueros controles y otros reactivos.
- p) Utilizar agua destilada o desionizada, de alta calidad.

Materiales y equipos necesarios para la Técnica de ELISA

- Kit ELISA para: VIH 1-2, HTLV I/II, HBsAg , Anti-HBc, HVC, Sífilis, enfermedad de Chagas.
- Micropipetas unicanal de rango fijo y/o variable (0.5 –10, 2-20, 20 – 200, 100 – 1000 ul)
- Micropipetas multicanal de rango fijo y/o variable de acuerdo a lo indicado en el inserto del kit
- Tips (puntas) universales de 200 uL
- Tips (puntas) universales de 1000 uL
- Reservorios para micropipeta multicanal
- Lentes protectores para laboratorio
- Mascarillas descartables
- Lavador de microplacas ELISA
- Lector de micro placas ELISA (con filtros adecuados a la técnica)
- Guantes de látex descartables no estériles
- Solución de Hipoclorito de Sodio al 5% (lejía)
- Depósito para descarte de material contaminado
- Guardapolvo manga larga
- Cronómetro de laboratorio
- Agua destilada o desionizada
- Papel toalla (absorbente)
- Incubadora 37° C
- Refrigeradora

Procedimiento de la Técnica de ELISA

- a) Determinar el número total de pocillos teniendo en cuenta todos los controles que indica el inserto del kit y control de calidad interna. Retire las tiras necesarias.
- b) Dispensar los microlitros indicados (según el inserto) de sueros controles positivos y negativos, sueros problema y sueros control interno en los respectivos micropocillos, mezclar suavemente.
- c) Incubar a la temperatura indicada por el tiempo necesario, generalmente en esta etapa se cubren los micropocillos con papel adhesivo que acompaña al kit, para evitar su evaporación.

- d) Retirar el material adhesivo y proceder con los ciclos de lavado teniendo en cuenta el volumen dispensado y el tiempo de remojo indicados en el instructivo. Después del último lavado secar la microplaca sobre un papel absorbente dándole pequeños golpes para remover cualquier exceso de líquido de los pocillos.
- e) Colocar la cantidad necesaria de conjugado en cada pocillo, la dilución del conjugado debe realizarse durante el último ciclo de lavado.
- f) Cubrir la placa con el papel adhesivo e incubar a la temperatura indicada por el tiempo necesario.
- g) Retirar el material adhesivo y proceder con los ciclos de lavado de acuerdo al paso 4.
- h) Durante el lavado prepare el volumen requerido de la solución substrato-cromógeno, la cual debe estar a temperatura ambiente y debe ser incolora, si se observa alguna coloración descartar la solución.
- i) Colocar la cantidad necesaria de substrato en cada pocillo e incubar en oscuridad a temperatura ambiente por el tiempo indicado.
- j) Detener la reacción agregando la cantidad indicada de solución de parada en la misma secuencia que se agregó el substrato.
- k) Leer la absorbancia de los pocillos en un lector de ELISA teniendo en cuenta los filtros indicados. Es recomendable una lectura bicromática teniendo como filtro de referencia 620-630 nm. Leer la microplaca en el tiempo indicado por el inserto.
- l) Evaluar la prueba teniendo en cuenta los criterios de validación que se indican en el instructivo del kit y suero control interno. Si la prueba es válida calcular el valor de corte e interpretar los resultados.
- m) Las muestras con resultados no reactivos se informan como tales.
- n) Las unidades de sangre cuyas muestras tienen resultados reactivos deberán ser eliminadas.
- o) Los donantes cuyos resultados son reactivos deben ser remitidos a la unidad de epidemiología.

Interpretación de Resultados

REACTIVO : Se detecta la presencia de antígeno y/o anticuerpo del agente etiológico correspondiente.

NO REACTIVO : No se detecta la presencia de antígenos y/o anticuerpos del agente etiológico correspondiente.

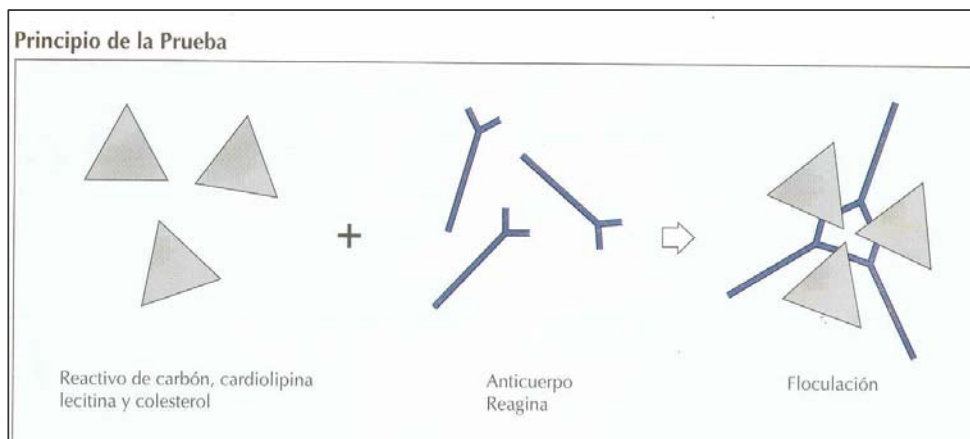
ZONA GRIS : Valores comprendidos inmediatamente por debajo del valor de corte de la prueba de acuerdo a lo indicado en el inserto.

Observación: En la técnica ELISA competitiva inversa los resultados NO REACTIVO son mayores al cut-off, y las lecturas menores que el cut-off son REACTIVO.

2.2 TECNICA RPR

El RPR es una prueba serológica no treponémica de floculación macroscópica, que se basa en la detección de anticuerpos conocidos como reaginas, presentes en suero o plasma de pacientes con Sífilis y a veces en personas con otras enfermedades agudas o crónicas, estos anticuerpos se combinan con las partículas de naturaleza lipídica del antígeno (cardiolipina, lecitina y colesterol) y por el contenido de carbón forma grumos de color oscuro, sobre el fondo blanco de la tarjeta. Si no hay anticuerpos la mezcla es homogénea.

La muestra a utilizar puede ser suero o plasma, éste último no debe tener más de 24 horas de haberse obtenido.



Fuente: Organon Teknika

Material necesario

- Kit RPR conteniendo:
 - Suspensión de antígeno VDRL modificado
 - Control positivo
 - Control negativo
 - Tarjetas plastificadas desechables
 - Pipetas de plástico desechables.
 - Espátulas de plástico desechables
 - Botella de plástico con dispensador
 - Agujas para dispensar
- Rotador automático graduado a 100 +/- 2 rpm.
- Micropipeta de un canal, rango fijo de 50 µl o variable de 10-100µl (opcional)
- Termómetro ambiental.
- Tips para micropipetas (TIPS) de 1-100 µl
- Guantes de látex descartables no estéril
- Mandil manga larga
- Solución de Hipoclorito de Sodio al 5% (lejía)
- Depósito para descarte de material contaminado

Procedimiento de la Técnica RPR

RPR Cualitativo

- a) En una tarjeta plastificada codifique los círculos, de modo que el primer círculo corresponda al control reactivo (R) el segundo círculo al control no reactivo (NR) y a continuación un círculo para cada muestra con su código respectivo.
- b) Con el dispensador del kit coloque una gota de suero (50µL) de cada una de las muestras y de los controles, sobre el círculo correspondiente.
- c) Con ayuda del aplicador, extender la muestra abarcando todo el círculo sin sobrepasar el borde.
- d) Agitar suavemente el frasco que contiene el antígeno RPR para homogenizarlo y luego trasvasarlo en el frasco de plástico (dispensador).
- e) Asegurarse que la gota de antígeno (17µl) no presente burbuja al momento de colocarla sobre la muestra (eliminar la primera gota).

- f) Coloque la tarjeta con las muestras sobre el rotador a 100 ± 2 rpm durante 8 minutos.
- g) Terminada la rotación, coger la tarjeta con ambas manos bajo una buena fuente de luz y agítela con movimientos de vaivén de 3 a 4 veces, observando la presencia de flóculos (grumos), los cuales pueden ser grandes o pequeños pero definidos.

EN CASO DE QUE SE USE KITS CUYOS PASOS DIFIERAN DE LO ANTERIORMENTE DESCRITO, SEGUIR LAS INDICACIONES DEL INSERTO.

Reporte de Resultados

REACTIVO : Cuando un suero presenta grumos grandes a medianos en el centro o periferia.

REACTIVO DEBIL: Cuando un suero presenta pequeños grumos en el centro o periferia.

NO REACTIVO : Cuando un suero no presenta grumos al finalizar la rotación

Interpretación de Resultados:

- a) Un resultado reactivo puede indicar infección presente o pasada con Treponemas patógenos; sin embargo esto puede ser una reacción falsa positiva la cual se confirma con pruebas treponémicas.
- b) Un resultado no reactivo indica que no hay infección por Treponemas.

Los donantes con resultados reactivos deben de ser derivados a la oficina de epidemiología donde se les indicara una nueva evaluación de las pruebas de tamizaje y la confirmación de estas con pruebas suplementarias como: Western Blot, Inmunoensayo en línea, Inmunofluorescencia indirecta, TPHA. FTA según el agente etiológico correspondiente.

CAPITULO II

CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN INMUNOSEROLOGÍA PARA CENTROS DE HEMOTERAPIA Y BANCOS DE SANGRE

2. CONTROL DE CALIDAD

Se entiende como control de calidad, a las actividades y técnicas operativas aplicadas sobre cada uno de los factores que influyen en los resultados de las pruebas de tamizaje.

2.1 Procedimientos generales

El control de calidad involucra una serie de aspectos que deben considerarse, tales como:

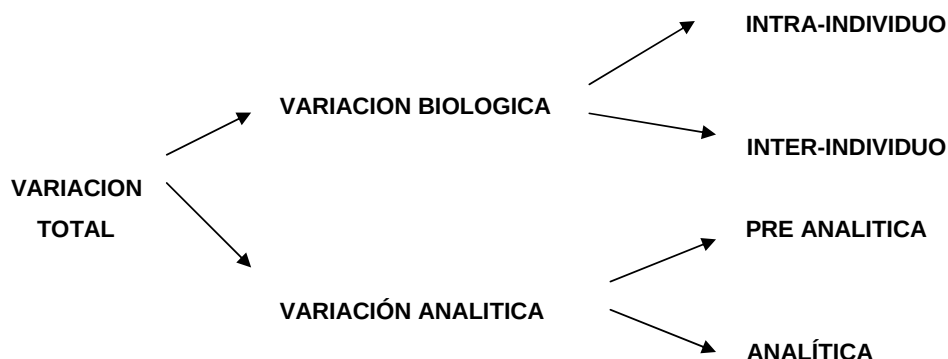
- a) Obtención e identificación de la muestra.
- b) Transporte de la muestra al laboratorio.
- c) Almacenamiento de la muestra.
- d) Método de análisis (procedimientos y reactivos).
- e) Mantenimiento y calibración de equipos.
- f) Disponer de manuales de procedimientos actualizados y al alcance del personal.
- g) Disponer de normas y prácticas de bioseguridad.
- h) Disponer de normas y prácticas de bioseguridad.
- i) Implementación de un programa de control de calidad interno orientado al mejoramiento continuo de la calidad.
- j) Participación en un programa de control de calidad externo (evaluación externa del desempeño).
- k) Asignación de un profesional supervisor de control de calidad que asegure que los procedimientos de control en uso se apliquen adecuadamente, proporcione capacitación y asistencia al personal, examine los datos de control y especifique cuando y cómo deben aplicarse acciones correctivas.

- l) Programa de capacitación y educación continua del personal del laboratorio con respecto a los efectos fundamentales del control de calidad.
- m) Evaluación de la competencia del personal de los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre.

2.2 Fuentes de Variación

Con el propósito de poder aplicar medidas preventivas en el control de la variación es necesario conocer las posibles fuentes de variación de un proceso analítico.

Se pueden clasificar en fuentes de variaciones: biológicas y analíticas, cada una con numerosas subdivisiones,



Variación Biológica

a) Variación Interindividuo:

Se refiere a las diferencias en el valor verdadero de un analito entre individuos. Como las poblaciones son heterogéneas, en la práctica se las subdivide por: edad, sexo, raza, etc.

b) Variación Intra-individuo:

Incluye todos los fenómenos regulatorios y en particular todos los ritmos biológicos, edad, estado nutricional etc., generalmente se producen variaciones en los resultados de laboratorio en relación a estos fenómenos. Es difícil separar las fuentes de variación por estar estrechamente relacionadas.

Variación Analítica

a) Pre analítico

Son la sumatoria de las fuentes de variación, desde la obtención de la muestra hasta que la muestra ingresa al sistema analítico, incluyendo los errores administrativos y aquellos inherentes a las muestras.

b) Analítico

Se producen debido a las condiciones del ambiente del laboratorio y del método de análisis (equipos)

Las fuentes de variación analítica se deben a errores sistemáticos o determinados y a errores aleatorios o indeterminados.

- **Errores Sistemáticos:**

Son errores que se hallan siempre en una dirección originados por causas identificables y corregibles. Son generados por desempeño inapropiado del analista, uso de materiales inadecuados o defectuosos, equipos mal calibrados, etc. Pueden ser detectados por controles externos, el parámetro que los mide es la **exactitud**.

- **Errores aleatorios:**

Error positivo o negativo cuya magnitud exacta no puede predecirse que influyen en cada medición en forma diferente. Su mayor o menor magnitud es la **precisión** del método o medición, es una medida de la **repetibilidad** de los mismos.

- **Exactitud.**

Grado de concordancia entre los resultados de una medición y un valor verdadero del mensurado.

- **Precisión**

Grado de concordancia entre los resultados de pruebas independientes, obtenidos en condiciones determinadas (estipuladas)

2.3 EVALUACIÓN DE LOS METODOS SEROLÓGICOS

2.3.1 Indicadores del valor de las pruebas de tamizaje

El criterio empleado para conocer el valor diagnóstico de una prueba utilizada para descartar sangre a transfundir, es evaluar su capacidad para distinguir una población de muestras provenientes de infectados de otra población de no infectados.

Sensibilidad:

Definida como la proporción de muestras positivas (reactivas) correctamente identificadas (ausencia de falsos negativos).

La sensibilidad de una prueba se puede calcular utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Sensibilidad} = \frac{\text{Verdaderos positivos}}{\text{Verdaderos positivos} + \text{Falsos negativos}} \times 100$$

Especificidad:

Definida como la proporción de muestras negativas (no reactivas) correctamente identificadas por la prueba empleada (es decir no produce falsos positivos).

La especificidad de una prueba se puede calcular utilizando la siguiente fórmula:

$$\text{Especificidad} = \frac{\text{Verdaderos negativos}}{\text{Verdaderos negativos} + \text{falsos positivos}} \times 100$$

Otros parámetros importantes para evaluar una prueba son los de **Valores Predictivos** (positivos y negativos) que tienen en cuenta, además de la sensibilidad y especificidad de una prueba, la prevalencia de la infección en el área donde se usará.

Valor Predictivo Positivo (VPP):

Es la probabilidad que tiene un individuo de estar infectado, cuando el resultado de la prueba que se practica ha resultado reactivo.

Valor Predictivo Negativo (VPN):

Es la probabilidad que tiene un individuo de no tener la infección que detecta la prueba cuando el resultado de la misma es no reactivo

2.4 ESTUDIO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS SEROLÓGICOS

El control estadístico es de utilidad en el laboratorio para mantener un rendimiento aceptable por medio de la evaluación, corrección y documentación de la variabilidad del proceso analítico.

Medidas de posición y variabilidad de los datos.

- a) Si se repite una medida con todos los cuidados recomendados, por un mismo operador y condiciones, los valores obtenidos no serán idénticos.
- b) Estos valores se distribuirán alrededor de uno más frecuente, que cuando el número de medidas es suficientemente grande, la representación gráfica de estas frecuencias versus sus valores, se acerca a la clásica campana de Gauss o de distribución normal. _____
- c) En esta distribución normal o de Gauss, el área comprendida entre la Media ($\bar{x}$) $\pm$ 1 desviación estándar representa cerca del 68% del área total. O sea el 68% de las mediciones se estiman comprendidas en ese rango. _____
- d) Si se considera el área comprendida entre ($\bar{x}$) $\pm$ 2 desviaciones estándar, se abarca cerca del 95% de las mediciones.
- e) Las medidas de posición y variabilidad que se definen son la media aritmética o media, la desviación estándar y el coeficiente de variación.

Media aritmética o media ($\bar{x}$): es el valor promedio del conjunto de las mediciones.

Desviación estándar (s): es una medida del alejamiento de los datos del valor promedio.

Coeficiente de variación (CV): es la desviación relativa de los datos respecto del valor promedio.

2.5 MONITOREO DE LOS PROCESOS SEROLOGICOS DE TAMIZAJE

Todos los procesos analíticos deben controlarse mediante la comparación con sueros de control. Existen básicamente dos maneras de hacerlo: con los controles diarios planificados por cada laboratorio (control interno) y con los programas interlaboratorio (control externo) planificados y ejecutados anualmente por el Instituto Nacional de Salud.

2.5.1 Control Interno

El control interno de la calidad tiene por objetivo asegurar el cumplimiento de todos los procedimientos establecidos para el trabajo del laboratorio y el monitoreo de la precisión de los resultados (construcción de gráfica de control) con el propósito de detectar y de corregir eventuales errores.

El suero de control interno (suero positivo débil), Es un Suero Control Estándar, obtenido de muestras o plasma desfibrinado de donantes negativos y positivos, preparados por cada laboratorio para cada prueba que se va a controlar, y deben ser alicuotados y conservados de modo que asegure su calidad y sus mismas características iniciales.

Todos los controles deben tratarse exactamente del mismo modo que las muestras desconocidas para validar el funcionamiento de la prueba. Los controles se trabajan simultáneamente y bajo las mismas condiciones que las muestras desconocidas. Luego de completado el procedimiento de la prueba, se examinan los resultados utilizando el mismo criterio para la interpretación.

Cuando los controles conocidos producen resultados aceptables, el control de calidad indica que:

- la prueba es válida
- Todas las condiciones de la prueba han sido cumplidas
- Todos los resultados de la prueba son confiables

2.5.2 Gráficas de Control

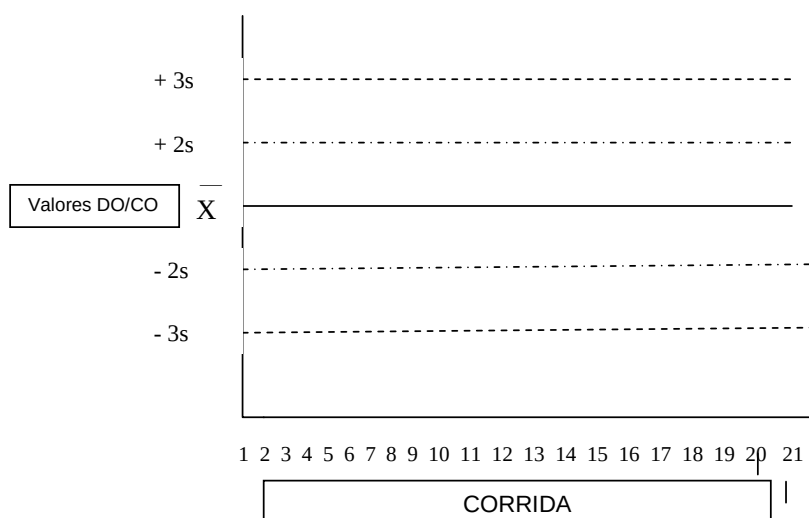
El monitoreo diario del proceso analítico de cada prueba se realiza a través de la evaluación de la prueba con sueros de control, construyendo Gráficas de Control de **Levey Jennings** con la repetición diaria de los resultados de estos sueros.

2.5.3 Uso del suero Control interno

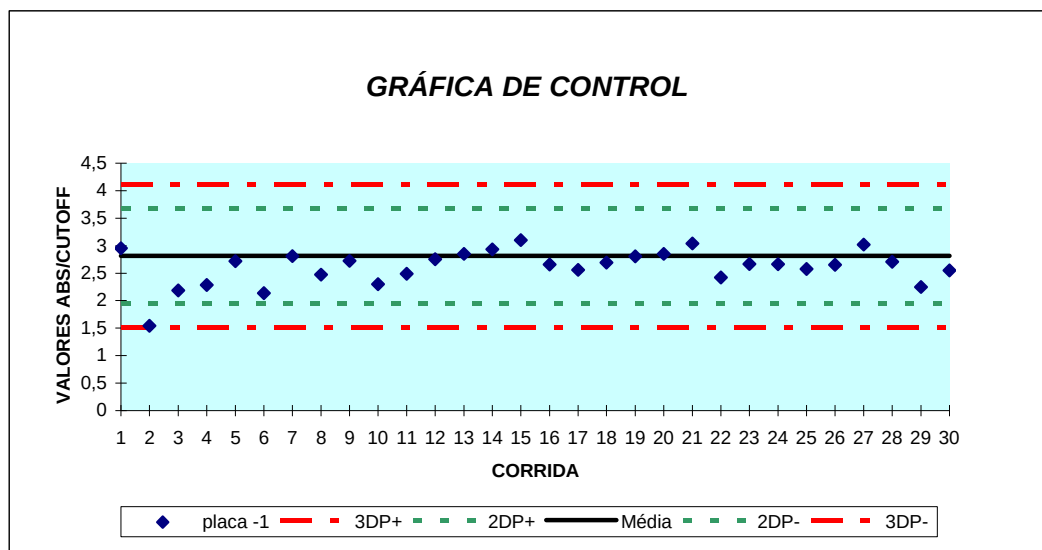
- a) Mantener las alícuotas del suero control interno en viales y conservarlos a menos 20 °C
- b) Realizar de 20 a 30 determinaciones del suero control interno en diferentes días para cada marcador serológico
- c) Calcular la relación densidad óptica / cut off o valor de corte (DO/CO) de las determinaciones realizadas por marcador.

- d) Calcular la media y la desviación estándar ($\pm 2s$ y $\pm 3s$) de los datos obtenidos en el paso c
- e) Construir el gráfico con los datos obtenidos para cada marcador.
- f) Incluir en cada corrida el suero control interno.
- g) Calcular la relación DO/CO de las corridas sucesivas y ubicar los puntos en la gráfica elaborada para cada marcador.

Gráfica de Control de Levey Jennings



Ejemplo:



2.5.4 Interpretación de la Gráfica de Control de Levey Jennings

La aplicación diaria de la gráfica permite al laboratorio observar cuando se producen irregularidades que se reflejan en los valores del mismo suero de control interno repetido para cada prueba:

- El valor obtenido está fuera del límite de $\pm 2s$
- Varios valores consecutivos muestran una tendencia al alza o sea valores cercanos al límite superior
- Varios valores consecutivos muestran tendencia a la baja, o sea valores cercanos al límite inferior.

Cuando los resultados de los sueros control interno caen fuera de los límites establecidos, deberá contarse con un esquema de decisiones a tomar, según sea el caso:

2.5.5 Reglas Múltiples de Shewart

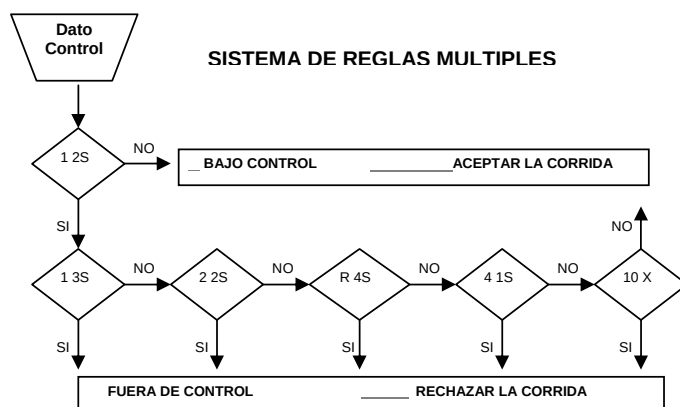
Regla 1: 2s : Una observación control excede el límite control $X \pm 2s$. Esta es una regla de advertencia y es interpretada como un requerimiento para una inspección adicional de la data control.

Regla 1: 3s: Una observación excede el límite control en $X \pm 3s$, La corrida debe ser rechazada.

- Regla 2: 2s: 2 observaciones de controles consecutivos exceden la media $\pm$ 2s. La corrida debe ser rechazada
- Regla 4: 1s: Cuando cuatro observaciones consecutivas exceden la media $\pm$ 1s. La corrida debe ser rechazada
- Regla 10: X: Cuando diez observaciones consecutivas están en un mismo lado de la media. La corrida debe ser rechazada

Cuando la corrida está fuera de control, determinar el tipo de error que se produjo basándose en la regla de control que fue trasgredida. Investigar las posibles fuentes de este tipo de error, corregir el problema luego volver a analizar toda la corrida incluyendo calibradores, controles y muestras.

TABLA DE DECISIONES.



2.6 CONTROL DE CALIDAD DE LA PRUEBA ELISA

La prueba ELISA es un procedimiento que involucra muchos pasos por lo cual se deben controlar adecuadamente para obtener el máximo rendimiento en precisión y exactitud.

Para el adecuado control de la técnica se debe observar lo siguiente:

- Leer el inserto que acompaña al kit antes de empezar la prueba para verificar si se cuenta con todo lo necesario para realizarla
- Realizar la prueba como lo indica el inserto colocando todos los controles que solicita, respetando la temperatura, tiempo de incubación, número y volumen de lavados.

- Dispensar los controles y muestras evitando la formación de burbujas que pueden alterar el volumen de las mismas.
- Utilizar puntas nuevas en cada prueba.
- Evitar el uso de material reciclado que podrían contener residuos de detergentes y producir resultados erróneos.
- Colocar el suero control interno en cada prueba para obtener la gráfica de control Levey Jennings.
- No utilizar reactivos fuera de la fecha de vencimiento.
- Realizar la validación de la prueba antes de aceptar los resultados.
- Si los criterios de validación no se cumplen, se invalida toda la corrida y se debe realizar una nueva prueba.

2.7 CONTROL DE CALIDAD DEL RPR

a) Antígeno RPR

- Si la ampolla se transporta congelada, descongelar una sola vez.
- La temperatura del ambiente de trabajo y de todo el material, incluyendo el antígeno, debe ser de 23 a 29 °C.
- La suspensión de antígeno no debe usarse después de la fecha de expiración.
- Antes de analizar la muestra la suspensión de antígeno debe controlarse con sueros controles de reactividad conocida.

b) Almacenamiento del Antígeno

- Se recomienda guardar el antígeno en refrigeración (2 a 8 °C).
- La ampolla conteniendo el antígeno, sin abrir y refrigerada, se mantiene bien durante 12 meses después de la fecha de manufactura. No debe congelarse.
- La suspensión de antígeno guardado, en frasco de plástico se mantiene bien hasta 3 meses si se guarda refrigerada entre 2 a 8 °C.

c) Tarjeta de diagnóstico

- No tocar con los dedos el área dentro de los círculos a fin de no engrasarla.
- Cada círculo debe usarse una sola vez.
- Descartar la tarjeta después de haberse usado al igual que las que se observen sucias o arrugadas.

d) Frasco de plástico para repartir el antígeno

- Se debe usar con la suspensión de antígeno que trae la caja (estuche o kit).
- Descartar al terminarse el antígeno.
- Anotar en el frasco el número de lote, fecha de expiración del antígeno y fecha en que se vació el antígeno de la ampolla al frasco de plástico. Se recomienda anotar estos datos en una etiqueta adherido al frasco.

e) Aguja para repartir el antígeno

- La aguja debe estar calibrada de acuerdo a las indicaciones del fabricante.

f) Rotador

- Determinar la velocidad de 100 rpm. Si la velocidad está por debajo de 95 rpm o sobre 110 rpm, la reacción tiende a disminuir la intensidad en suero no diluido.
- Controlar la velocidad del rotor.

g) Área de trabajo

- La temperatura del área de trabajo y de los reactivos del kit, deben estar entre 23 a 29°C.
- Debe ser bien iluminada y limpia

h) Lectura de la prueba RPR

- Realizar la lectura inmediatamente después de la agitación en el rotador bajo una fuente luminosa potente.
- No se debe leer la prueba RPR con luz fluorescente porque las reacciones mínimas o moderadas pueden omitirse.
- Antes de leer, rotar nuevamente la tarjeta haciendo movimientos hacia atrás y adelante 3 a 4 veces.

i) Causales de error en la prueba RPR

- **Falsa Negativa:** Mal funcionamiento del rotador, exceso de suero, antígeno en cantidad excesivo o insuficiente, reactivos fríos (suero, antígeno), temperatura ambiente por debajo de 23 °C, antígeno vencido, exceso de agitación del antígeno, antígeno poco sensible, error de lectura especialmente en reactivo mínimo.
- **Falsa Positiva:** El suero se ha dejado secar antes de agregar el antígeno, rotación prolongada (mas de 8 minutos), temperatura ambiente sobre 29 °C, error de lectura, antígeno rugoso

3. MANTENIMIENTO Y CALIBRACION DE EQUIPOS

Se debe incluir un programa de mantenimiento de equipos preventivo para asegurar un desempeño óptimo del equipo. El mantenimiento preventivo es la mejor medida para asegurar que el equipo funcionará adecuadamente. Todos los reportes que se generen de estas calibraciones y mantenimiento deben ser archivados apropiadamente.

3.1. Analizador de ELISA (Lector de Microplacas)

- Diariamente:
- Chequear que los filtros funcionen correctamente o cada vez que se utilice el equipo.
- Verificar que la calibración del analizador es adecuada. Cuando se inician las operaciones diarias, permitir que el analizador se caliente durante 30 minutos. A continuación realizar una lectura en blanco y luego leer una placa llena de sustrato. Las lecturas deben ser idénticas. Si no lo son invertir la placa y repetir la lectura, a fin de determinar si la desviación se origina en la placa o en el lector.
- Examinar el avance automático de la placa. El mismo debe ser suave y constante.
- Semanalmente:
- Realizar una limpieza externa del equipo con alcohol de 70% y/o una solución adecuada no abrasiva.
- Realizar el mantenimiento preventivo del equipo trimestral o semestralmente de acuerdo al uso. Siguiendo las recomendaciones dadas por la OPS.
- Cada seis meses realizar una limpieza de los filtros y una calibración por un personal debidamente entrenado.

3.2. Lavador de microplacas ELISA

- Diariamente:
- Verificar el volumen dispensado.
- Comprobar la uniformidad del llenado.
- Verificar la eficiencia del subsistema de aspiración.
- Confirmar la limpieza de las agujas de suministro y extracción.
- Limpiar el lavador con agua destilada después de haberlo utilizado, para remover cualquier vestigio de sal en los conductos de los subsistemas de suministro y extracción. Las agujas pueden mantenerse sumergidas en agua destilada.
- Verificar la limpieza del cuerpo del lavador. Si es el caso, limpiar las superficies exteriores con una pieza de tela humedecida, con un detergente suave.
- Descartar la solución de desecho antes que se sature el frasco.
- Realizar el mantenimiento preventivo del equipo trimestral o semestralmente de acuerdo al uso. Siguiendo las recomendaciones dadas por la OPS.
- Cada seis meses realizar una limpieza de los filtros y una calibración por un personal debidamente entrenado.

3.3 Equipos Automatizados

- Generalmente estos equipos cuentan con un programa de calibración interno por lo cual antes de iniciar un ensayo verificar que el reporte que emite el equipo estén dentro de los parámetros de calidad establecidos para el equipo en cuanto al sistema óptico, mecánico y de temperatura.
- Solicitar que la empresa proveedora del equipo realice trimestralmente el mantenimiento preventivo del equipo para asegurar su eficiencia.

3.4 Incubadora

- Registrar La temperatura diariamente al iniciar y al terminar la jornada de trabajo .Colocar los registros en un lugar visible.
- Desconectar la incubadora antes de iniciar los procesos de limpieza. Cada 15 días realizar una limpieza externa e interna del equipo con alcohol al 70% o con solución no abrasiva. Esperar a que la incubadora este seca libre de humedad antes de proceder a su reconexión.
- Realizar el mantenimiento preventivo del equipo trimestral o semestralmente de acuerdo al uso. Siguiendo las recomendaciones dadas por la OPS.
- Una vez al año hacer la calibración del equipo por un personal debidamente entrenado.

3.5 Rotador Serológico

- Semanalmente realizar una limpieza externa del equipo con alcohol al 70% o con solución no abrasiva.
- Una vez al año hacer la calibración del equipo por un personal debidamente entrenado.

3.6 Micropipetas

Las micropipetas son instrumentos básicos en todo laboratorio, la forma en que se manipulan estos instrumentos tienen un efecto directo en la precisión de los resultados del laboratorio por lo cual es necesario tener en cuenta algunas consideraciones:

- Seleccione una micropipeta con el rango adecuado al volumen que necesita. Nunca exceda el rango de la micropipeta porque se puede dañar y descalibrar.

Recomendaciones generales:

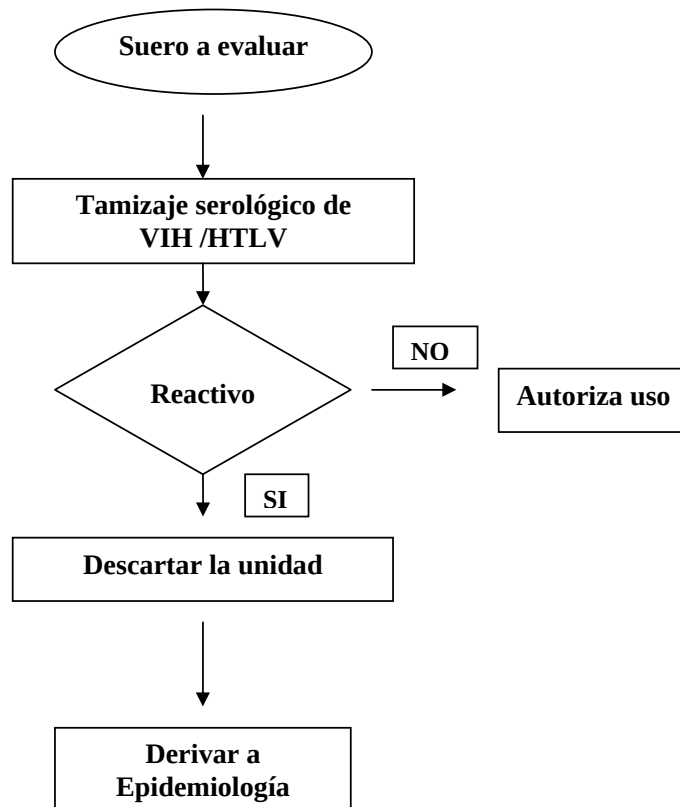
- Verifique que la micropipeta se encuentra en posición vertical, cuando se requiera aspirar un líquido. La posición vertical garantiza que no se presente incertidumbre por variaciones mínimas en la cabeza del líquido.
- Al utilizar la micropipeta presione el émbolo hasta el primer tope, coloque la punta apenas por debajo de la superficie de la muestra, verifique la profundidad de acuerdo al manual del fabricante, luego aspire lentamente y así obtendrá el volumen adecuado.
- Colocar la punta de la micropipeta en la pared del recipiente donde se dispensará el líquido. Verificar que el ángulo formado entre la punta de la micropipeta y la pared de elemento receptor esté entre los 30° y 45°.
- Dispensar el contenido de la micropipeta presionando el émbolo hasta el primer tope manteniendo en todo momento el contacto entre la punta de la micropipeta y la pared del recipiente receptor.
- Presionar el émbolo suavemente hasta el segundo tope para expulsar cualquier fracción de líquido que hubiera podido quedar en la punta de la micropipeta. Retirar la micropipeta y liberar suavemente el émbolo hasta su posición inicial.
- Expulsar la punta de la micropipeta con el botón del mecanismo de expulsión.
- Inspección diaria:
- Verificar la integridad y ajuste de los mecanismos. Los mismos deben poder moverse de forma suave. El pistón debe desplazarse suavemente.
- Confirmar que el porta puntas no presente distorsiones o marcas de desgaste, dado que es esencial para la exactitud de las medidas.
- Verificar el ajuste de las puntas, para ello colocar una de ellas y llenarla con agua destilada
- Limpieza y descontaminación:

- Verificar cada día que la micropipeta se encuentra limpia, en sus superficies interiores y exteriores. Diariamente realice una limpieza externa que puede ser con alcohol de 70 % o con lejía al 1% para eliminar el material biológico que pudiera contener.
- Esterilizar la micropipeta siguiendo las indicaciones del fabricante. Si una micropipeta ha sido utilizada con sustancias peligrosas para la salud es responsabilidad del usuario asegurar que este completamente descontaminada, antes de que la misma sea utilizada en otros procedimientos o sea retirada del laboratorio
- Cada seis meses calibre la micropipeta, algunas micropipetas traen un instructivo de calibración y herramientas para hacer los ajustes necesarios.

ANEXOS

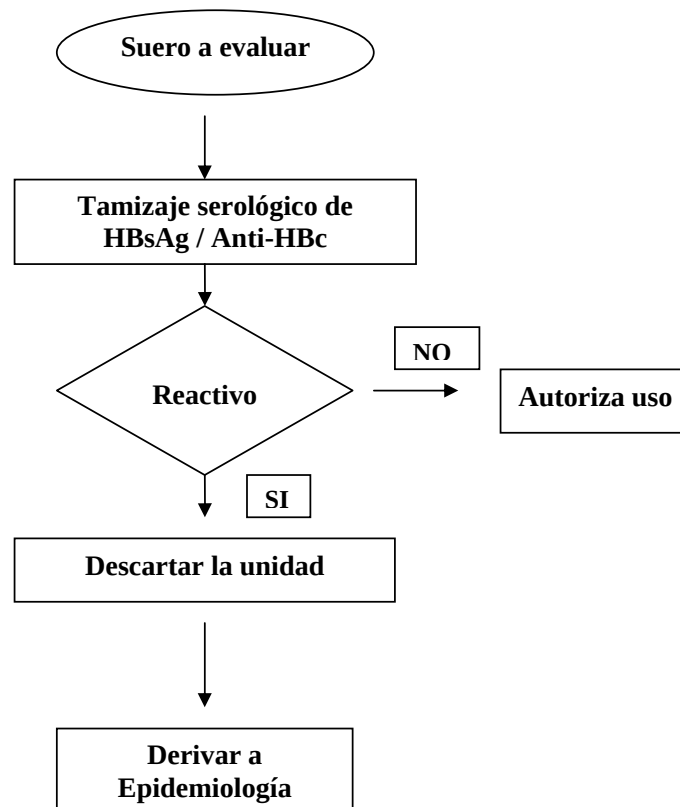
ANEXO A

VIH y HTLV



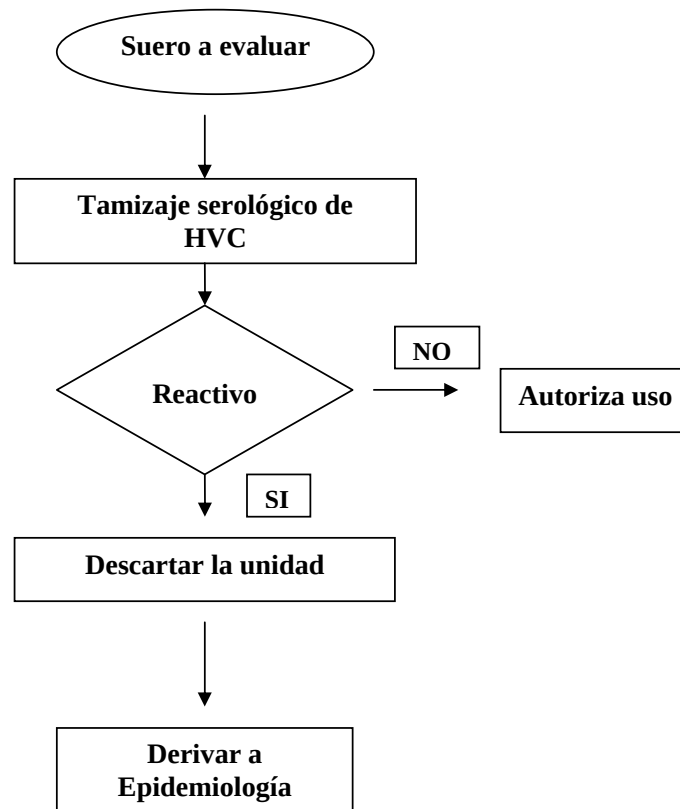
ANEXO B

HBsAg, Anti-HBc



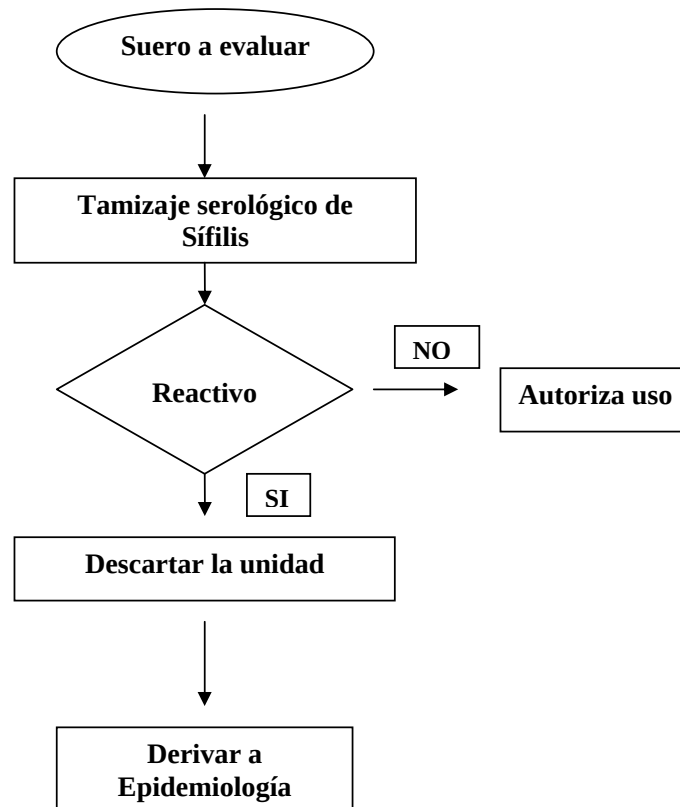
ANEXO C

Anti HVC



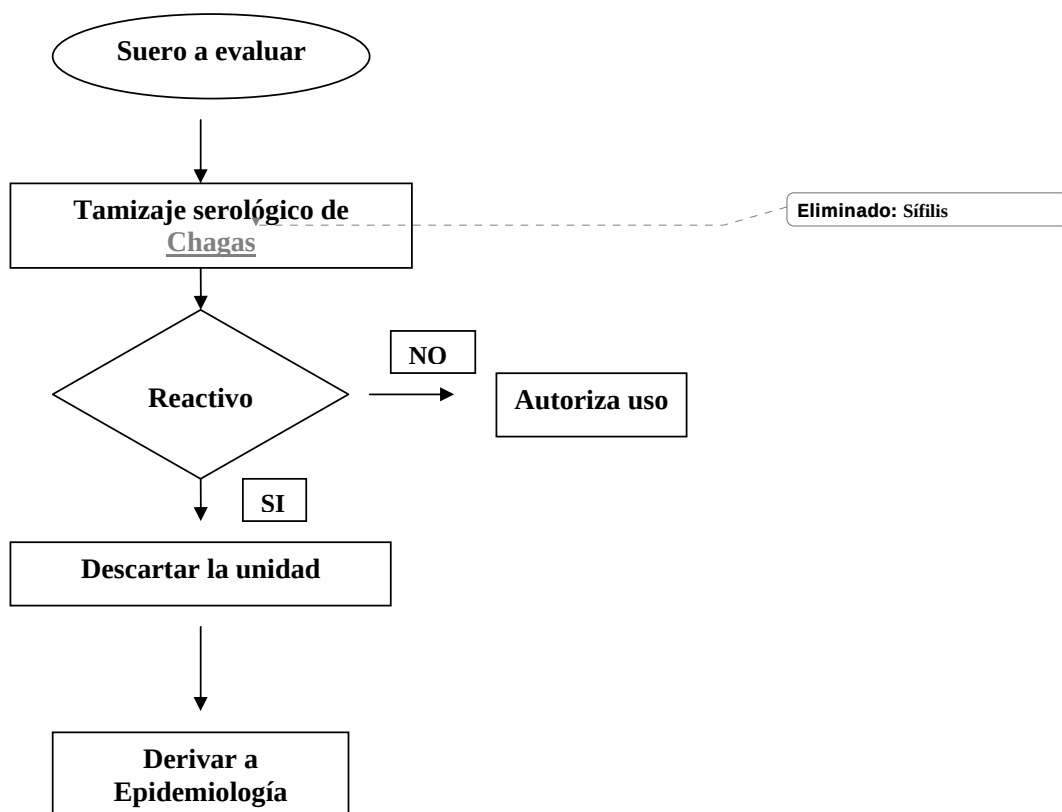
ANEXO D

SIFILIS



ANEXO E

ENFERMEDAD DE CHAGAS



ANEXO F

PROTOCOLO DE TRABAJO ELISA NOMBRE DEL REACTIVO:												
Fecha								Marca del Reactivo				
Valor de Corte								Lote N°				
Zona Gris								Fecha de Vcto.				
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												
RESPONSABLE								REVISADO POR				
FIRMA								FIRMA				

Adjuntar hoja impresa del reporte del Analizador de ELISA

ANEXO G

PROTOCOLO PARA PRUEBAS DE TAMIZAJE SEROLÓGICO DE SIFILIS (RPR)

NOMBRE DEL REACTIVO:.....

Fecha de procesamiento:

Antígeno: Marca:..... Lote N°

Fecha de Vencimiento: Presentación del kit:

CONTROLES	RESULTADO
Positivo	
Negativo	

N°	Código de la muestra	Resultado del análisis Cualitativo
01		
02		
03		
04		
05		
06		
07		
08		
09		
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		

Observaciones:.....

RESPONSABLE	REVISADO POR
FIRMA	FIRMA

7.-NIVELES DE RESPONSABILIDAD

7.1 Es responsabilidad del Director del Establecimiento de Salud, del Jefe del Departamento y/o Servicio al que está adscrito el Centro de Hemoterapia y Banco de Sangre, del Jefe del Departamento y/o Servicio de Patología Clínica del Centro de Hemoterapia y Banco de Sangre del Sector Salud, difundir e implementar todos los aspectos relacionados a la aplicación del presente Manual.

7.2 Del responsable de la calidad y del personal que labora en los Centros de Hemoterapia y Bancos de Sangre que realizan el tamizaje inmunoserológico de las unidades de sangre, cumplir con aplicar todos los aspectos considerados en el presente Manual.

8. ABREVIATURAS

DO: Densidad Óptica.

CO: Cut Off o Valor De Corte.

S: Desviación estándar.

X: Promedio

RPR: Reagina Plasmática Rápida.

VDRL: Venereal Disease Research Laboratory.

TRUS: Toluidine Red Unheated Serum Test.

FTA-ABS: Fluorescent Treponemal Antibody – Absorption.

TPHA: Hemaglutinación para anticuerpos a *Treponema pallidum*.

9. GLOSARIO DE TERMINOS

Anticuerpos: (Inmunoglobulinas) Proteína protectora producida durante la respuesta inmune ala estimulación causada por una sustancia, generalmente una proteína extraña. Actúa en la defensa contra los microorganismos, a menudo por neutralización o reconocimiento de los patógenos como agentes extraños que deben ser eliminados.

Antígeno: Sustancia reconocida como extraña que induce una respuesta por parte del sistema inmunológico.

Antígeno de recombinación: Antígenos que se producen cuando parte del genoma del microorganismo (antígeno) se inserta en un vehículo biológico, lo que redunde en la producción de productos genéticos que pueden fácilmente replicarse en el huésped.

Alícuota: Es una parte determinada de un todo con su misma composición. Término general que se refiere a cualquier disolución, muestra, mezcla, etc.

Calibración: Procedimiento mediante el cual se relaciona la lectura con la magnitud que se va a leer

Coefficiente de variación: el grado con el que los datos numéricos tienden a alejarse del promedio; un indicador de la reproducibilidad de los valores.

Conjugado: En la prueba ELISA, una enzima unida a un anticuerpo.

Contaminación entre muestras: Influencia de una muestra sobre la siguiente. Problema que afecta a los instrumentos automatizados

Control de Calidad: (CC) Aquellas medidas que deben ser incluidas durante cada prueba para verificar que la prueba está funcionando correctamente.

Control de Calidad Interno o intralaboratorio: Procedimiento por el cual se emplea los resultados de un solo laboratorio con fines de control de calidad.

Control de calidad Externo o Interlaboratorio: Procedimiento por el cual se emplean los resultados de varios laboratorios que analizan el mismo espécimen con fines de control de calidad.

Corrida: ensayo en el que un grupo de sueros son analizados juntos.

Cromógeno: Compuesto sintético soluble que cambia de color como consecuencia de la oxidación, reducción u otra modificación química provocada por el marcador enzimático

Cut Off o Valor De Corte (CO): Punto de referencia para determinar si la lectura de la densidad óptica que se obtiene de una prueba ELISA representa un resultado Reactivo o No reactivo. El punto de corte se calcula habitualmente sobre la base del promedio de los valores de los controles negativos

Densidad óptica: Unidades expresadas por un lector microplacas ELISA que representan la luz absorbida por el producto final coloreado de una reacción ELISA.

Desviación estándar: Medida de variación que define el rango esperado de un valor en relación al valor promedio.

Error Sistemático o determinado: Error originado por causas identificables y corregible.

ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay (ensayo inmunoenzimático ligado a enzimas).

Enzima: Catalizador orgánico. En la prueba de ELISA, la enzima actúa sobre un sustrato específico para crear un producto final coloreado que se mide y refleja la cantidad de enzima fijada específicamente en la reacción.

Error aleatorio, indeterminado o causal: Error originado por causas aleatorias o fortuitas y probablemente no corregibles

Especificidad: capacidad de la prueba para identificar todos los negativos correctamente.

Falso Negativo (FN): Resultados negativos (no reactivos) obtenidos por la prueba con las muestras de la población infectada.

Falso Positivo (FP): Resultados positivos (reactivos) obtenidos por la prueba con las muestras de la población no infectada.

Floculación: Formación de flóculos (grumos) suspendidos en el medio acuoso a consecuencia de la reacción antígeno-anticuerpo.

Indeterminado: Resultado que no puede ser clasificado como positivo o negativo en base a los resultados de una prueba.

Sueros Controles: suero positivo y negativo incluidos en el estuche de una prueba (kit) y analizados en cada corrida

No reactivo: Información del resultado de una prueba de detección de anticuerpos indicando que la prueba no detectó evidencia de infección.

Péptidos sintéticos: Péptidos creados en el laboratorio combinando aminoácidos en una secuencia conocida para formar un péptido deseado.

Período de Ventana: Período que transcurre entre la infección y aparición de antígenos o anticuerpos detectables

Plasma. Parte líquida de la sangre y la linfa. Constituye del 30 al 50 por ciento de la sangre, conteniendo nutrientes, electrolitos, que son sales disueltas, gases, albúmina, factores de coagulación, desperdicios y hormonas.

Prevalencia. Número de casos de un evento, por ejemplo una enfermedad, en una población específica y en un momento determinado. Regularmente se expresa en términos de porcentaje.

Reactivo: Información del resultado de una prueba de detección que indica que se identificó la infección.

Reagina: Anticuerpo plasmático inespecífico.

Relación D.O./CO: Lectura de la densidad óptica de una prueba dividida por el valor de corte.

Sensibilidad: Capacidad de una prueba para detectar muy pequeñas cantidades de sustancias a se analizadas en un suero o la capacidad de una prueba para detectar individuos infectados.

Seroconversión: Punto en el cual puede detectarse por primera vez un anticuerpo específico en un individuo infectado que previamente había tenido un resultado negativo en una prueba para detectar anticuerpos.

Seroprevalencia. Porcentaje de personas en un lugar y tiempo determinados que tienen anticuerpos contra alguna enfermedad, lo que indica qué porcentaje de ellos han tenido contacto con un agente infeccioso específico

Suero Control externo: Suero de control con valores conocidos derivados de una fuente distinta a los incluidos en el kit de prueba. Estos controles se incluyen en las corridas de la prueba para controlar el desempeño uniforme o la variación entre los lotes del reactivo

Sustrato: Químico específico activado por una enzima para formar un producto coloreado.

Tamizaje: Selección

Verdadero Positivo (VP): Resultado positivo (reactivo) obtenido por la prueba con las muestras de la población de infectados.

Verdadero Negativo (VN): Resultados negativos (no reactivos) obtenidos por la prueba con las muestras de la población no infectada.

Zona gris: Resultados de pruebas que caen dentro de una zona definida inmediatamente por debajo del valor de corte. Los resultados que caen dentro de esta zona justifican a menudo la evaluación por otras pruebas y/o de una nueva muestra.

10. BIBLIOGRAFIA

1. Manual de Procedimientos Técnicos para el diagnóstico de Sífilis. Lima: Ministerio de Salud. Instituto nacional de Salud. Red Nacional de Laboratorios: 1997. Serie de Normas Técnicas N° 17.
2. Ernest T. Creighton. Rapid Plasma Reagin (RPR) 18mm Circle Card Test. A Manual of Test for Syphilis. 1990. American Public Health Association. Washington, DC.
3. Dra. Pilar León Rega, Dr. José Manuel Echevarría. Virus de la Hepatitis C Breve Revisión General y actualización del diagnóstico de Laboratorio. Mayo. Servicio de Microbiología Diagnóstica. Centro Nacional de Microbiología. Instituto de Salud Carlos III.
4. Norma ISO/IEC 43-1 1997
5. Organización Panamericana de la Salud. Manual de Procedimientos y Control de Calidad para los laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. Febrero 1994.
6. Instituto de Salud Pública de Chile. Ministerio de Salud. Manual de Control de Calidad en el Laboratorio Clínico. 1998
7. Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud. Programa de SIDA de Naciones Unidas. Sangre y Componentes seguros. Pesquisa de HIV y otros agentes infecciosos.
8. Niel T. Constantine, Johnny D Callahan, Douglas Watts. Pruebas para la Detección del VIH y Control de Calidad. 1991
9. Ministerio de Salud. PRONAHEBAS. Sistema de Gestión de la Calidad del PRONAHEBAS: Manual de Bioseguridad. NT N° 015-MINSA/DGSP-V.01. Lima Perú 2004.
10. www.cdc.gov/std/spsnidh/STDFact-Syphilis-s.htm. Sífilis – Enfermedad de Transmisión Sexual. En Departamento de Salud y Servicios Humanos de Centro para el Control y la Prevención de Enfermedades, pp 6.
11. Oficina General de Epidemiología (OGE) Ministerio De Salud-Estadísticas VIH - 2005
12. Robinson Cabello, estadísticas de VIH al año 2005, clínica de ITS y VIH Vía Libre-Perú
13. Virus linfotrópico humano de células T tipo 1 (HTLV-1): una infección endémica en el Perú. Eduardo Gotuzzo H, Kristien Verdonck B, Elsa Gonzales L, Miguel Cabada S. Revista Peruana de Medicina Experimental y Salud Pública. 2004.

14. Organización Mundial de la Salud. Organización Panamericana de la Salud. Manual de Mantenimiento para Equipo de Laboratorio. Documentos Técnicos. THS/EV-2005/007.
15. Manual de Procedimientos de Laboratorio para el Diagnóstico de la Trypanosomiosis Americana (Enfermedad de Chagas). Lima Ministerio de Salud. Instituto nacional de Salud. 1999. Serie de Normas Técnicas N° 26.

