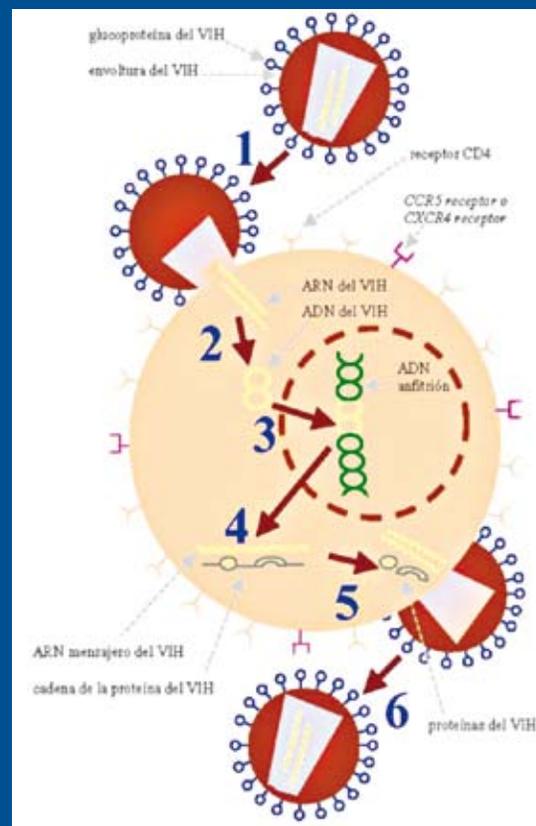
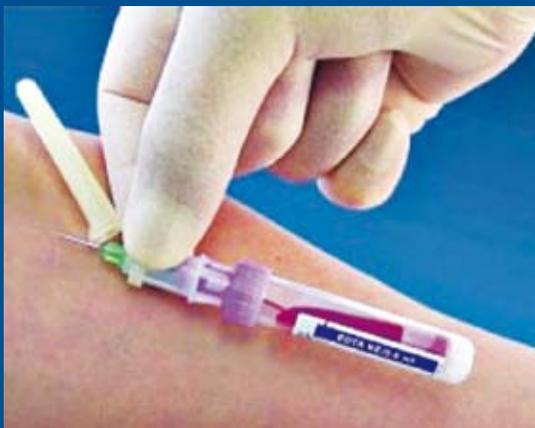




MINISTERIO DE SALUD

MANUAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE VIH



SEGUNDA EDICIÓN
SAN SALVADOR, EL SALVADOR, C.A.
SEPTIEMBRE DE 2010

MINISTERIO DE SALUD

VICEMINISTERIO DE POLÍTICAS SECTORIALES

DIRECCIÓN DE REGULACIÓN

UNIDAD DE VIGILANCIA LABORATORIAL

“MANUAL PARA EL CONTROL DE CALIDAD DE LAS PRUEBAS DE VIH”

SEGUNDA EDICIÓN

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, SEPTIEMBRE DE 2010



FICHA CATALOGRÁFICA

2010 Ministerio de Salud

Todos los derechos reservados. Está permitida la reproducción parcial o total de esta obra, siempre que se cite la fuente y que no sea para la venta u otro fin de carácter comercial.

Es responsabilidad de los autores técnicos de este Manual, tanto su contenido como los cuadros, diagramas e imágenes.

La documentación oficial del Ministerio de Salud puede ser accesada a través de: <http://www.salud.gob.sv>

Normas, Manuales y Guías

Tiraje: 2ª Edición, 2010. 1,152 ejemplares.

Edición y distribución

Ministerio de Salud

Viceministerio de Salud de Políticas Sectoriales

Programa Nacional de ITS/VIH/sida

Calle Arce No. 827, San Salvador. Teléfono: 2202-7000.

Página oficial: <http://www.salud.gob.sv>

Diseño de Proyecto Gráfico: Imprenta Criterio

Diagramación: Imprenta Criterio

Impreso en El Salvador por: Imprenta Criterio

El Salvador. Ministerio de Salud. Viceministerio de Salud de Políticas Sectoriales. Dirección de Regulación. Programa Nacional de ITS/VIH/sida. Manual para el Control de Calidad de las Pruebas de VIH, 2ª. Edición. San Salvador. El Salvador, C.A.: Fondo Global. 90 p. Normas, Manuales y Guías.

1. Programa Nacional ITS/VIH/sida. 2. Ministerio de Salud.
3. Fondo Global.

ÍNDICE

| | Pág. |
|---|------|
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| II. OBJETIVOS: GENERAL Y ESPECÍFICOS | 2 |
| III. CONTENIDO | 3 |
| A. Red Nacional de Laboratorios VIH/sida..... | 3 |
| B. Descripción del Flujograma para el Diagnóstico Pruebas VIH/sida | 5 |
| C. Control de calidad | 7 |
| D. Condiciones del lugar de trabajo y personal. | 26 |
| E. Equipos | 27 |
| F. Descripción de Procesos preanalíticos | 28 |
| G. Descripción de Procesos analíticos | 34 |
| H. Descripción de Procesos postanalíticos..... | 46 |
| I. Bioseguridad..... | 49 |
| IV. REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN | 50 |
| V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 51 |
| VI. GLOSARIO | 53 |
| VII. ABREVIATURAS Y SIGLAS..... | 56 |
| VIII. ANEXOS..... | 59 |

AUTORES

- Lic. Ana Thelma Méndez de Pineda Unidad de Vigilancia Laboratorial
- Lic. Rosa Nelly Arguera Montoya Unidad de Vigilancia Laboratorial
- Lic. Marmin Ruth Carrillo de Sosa Unidad de Vigilancia Laboratorial
- Lic. Lisette Esmeralda Ruiz Programa Nacional VIH/sida
- Lic. Marta Lilian González Hospital Nacional de Santa Ana
- Lic. Lilian América Amaya Hospital Nacional Benjamín Bloom
- Lic. Margarita de Castillo Hospital Nacional de Maternidad
- Lic. Ana Isabel de Santos Unidad de Salud San Miguelito
- Dr. Juan Carlos Navidad Programa Nacional VIH/sida
- Dr. Herbert Leonel Díaz Orellana Dirección de Regulación
- Lic. Ulises Rodríguez Consultor

AGRADECIMIENTOS

El comité técnico responsable de la autoría de este documento reconoce los valiosos aportes en conocimientos y experiencias sobre el tema, brindados por los expertos Lic. Blanca Sonia Velásquez de Pérez, Lic. Ulises Rodríguez y los profesionales de la salud, médicos y de laboratorio clínico, quienes participaron en el proceso de validación del documento.



Ministerio de Salud



HOY SE EMITIÓ LA RESOLUCIÓN MINISTERIAL No.161 QUE DICE:

“Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, San Salvador, a los catorce días del mes de septiembre del año dos mil diez. CONSIDERANDO: Que de conformidad al Art. 78 del Reglamento de la Ley de Prevención y Control de la Infección Provocada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, que establece la potestad de la Titular de esta Secretaría de Estado, para emitir instrumentos técnicos en materia de salud; Que es necesario disponer con una herramienta técnica para contribuir a la prevención, detección, curación y manejo oportuno de las infecciones de transmisión sexual y del virus de la inmunodeficiencia humana, POR TANTO: En uso de sus facultades legales, RESUELVE emitir el “**Manual para el Control de Calidad de las Pruebas de VIH**”, en consecuencia a partir de la oficialización es de obligatorio cumplimiento por parte de todos los servidores de la red de Establecimientos Públicos de Salud, para lo cual se debe proceder a su divulgación e implantación a partir de esta fecha; HÁGASE SABER. La Titular del Ramo de Salud Pública, (F).M.I. Rodríguez.”



DIOS UNIÓN LIBERTAD

Firma manuscrita de María Isabel Rodríguez.

María Isabel Rodríguez
MINISTRA

I. INTRODUCCIÓN

De conformidad con la Ley y Reglamento de Prevención y Control de la Infección provocada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana, vigentes desde noviembre de 2001 y mayo de 2004 respectivamente, establece que el Ministerio de Salud es la entidad rectora y puede emitir protocolos de atención, normas técnicas, instructivos y las disposiciones necesarias para facilitar y lograr mayor eficiencia en la aplicación de la Ley y del Reglamento.

Con base en lo anterior se hace necesario actualizar el documento regulatorio denominado "Manual para el Control de Calidad de las pruebas de VIH", con el propósito de asegurar que los resultados obtenidos en los análisis, sean correspondientes al estado serológico del paciente.

Los laboratorios de la red nacional deben cumplir en forma obligatoria el control de calidad que incluya procesos, procedimientos y tareas, efectuadas en forma precisa y correcta, con excelencia técnica y científica.

El Manual se ha estructurado describiendo los principales procesos y procedimientos relacionados con la calidad de las pruebas VIH, en las etapas preanalítica, analítica y postanalítica; así como las prácticas de bioseguridad y las medidas generales que deben ejecutarse en los laboratorios clínicos.

II. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Fortalecer el control de calidad en los laboratorios VIH y bancos de sangre, a través de la aplicación de lineamientos en las etapas preanalítica, analítica y postanalítica, para asegurar la calidad de los resultados de las pruebas serológicas utilizadas en la detección y seguimiento de la infección por VIH.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- Orientar en los procedimientos y metodologías que permitan la capacitación e información del profesional de salud, que realiza análisis para la detección de anticuerpos VIH.
- Mejorar la eficacia en los laboratorios de la red nacional que realizan las pruebas de VIH.
- Asegurar el control de calidad en el tamizaje de anticuerpos a las unidades de sangre colectadas, para ofrecer sangre y componentes seguros a la población que lo requiere.

III. CONTENIDO

A. RED NACIONAL DE LABORATORIOS DE VIH/SIDA

De acuerdo con la complejidad de cada establecimiento de salud se aplica el tipo de pruebas que corresponde y las funciones técnicas específicas.

1. LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA VIH/SIDA (LNR)

- Cumplir las normas técnicas relacionadas con el laboratorio clínico, para realizar las pruebas.
- Supervisar y evaluar a los laboratorios de confirmación de VIH en el cumplimiento del flujograma diagnóstico. (Anexo No. 1).
- Confirmar la infección por VIH y realizar las pruebas de seguimiento: carga viral y linfocitos CD4-CD8, para supervisar y evaluar la condición inmunológica y virológica del paciente.
- Participar en evaluaciones externas de la calidad con instituciones de referencia internacional.
- Dirigir, organizar y ejecutar la evaluación externa de la calidad a los laboratorios VIH de la red nacional; la evaluación es preparada por el Laboratorio Nacional de Referencia VIH/sida y la sección de Banco de Sangre del área de Laboratorio Clínico de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.
- Elaborar y distribuir controles de calidad para VIH, a solicitud de los establecimientos del primer nivel de complejidad.
- Coordinar la recepción de muestras y documentación para estudios de resistencia al VIH.
- Preparar el envío de muestras al exterior, de acuerdo con la norma internacional para embalaje. Participar en los estudios de investigación de campo de vigilancia epidemiológica, en apoyo al Programa Nacional de ITS/VIH/sida.
- Recopilar, consolidar y analizar la información estadística cualitativa y cuantitativa de los exámenes realizados por la red de laboratorios públicos e informar a las autoridades superiores.

- Evaluar técnicamente los reactivos para el diagnóstico de VIH, según el protocolo de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.
- Proporcionar asesoría cuando sea requerido a los laboratorios públicos, para la ejecución de las técnicas serológicas del VIH.
- Actualizar al personal de salud de la red de laboratorios, sobre temas relativos al diagnóstico laboratorial de VIH.

2. LABORATORIOS PARA LA CONFIRMACIÓN DE LA INFECCIÓN POR VIH

- Asesorar a los laboratorios de VIH de su competencia, en el cumplimiento de los procedimientos técnicos.
- Coordinar con los establecimientos de la red, para la referencia oportuna de las muestras que requieren confirmación del diagnóstico, en un periodo máximo de una semana.
- Referir al Laboratorio Nacional de Referencia VIH, muestras de pacientes que ameriten otros estudios complementarios, como Western Blot.
- Participar en la evaluación externa de la calidad.
- Procesar, analizar y emitir los resultados de las pruebas de VIH, a los establecimientos de salud u otras instituciones que hayan solicitado confirmación de la infección por VIH.
- Requerir la información estadística con oportunidad y fiabilidad de acuerdo a la calendarización establecida.

3. BANCOS DE SANGRE

- Establecer, documentar e implantar los procedimientos de calidad que aseguren el cumplimiento de los estándares de trabajo, principalmente para prevenir la transmisión de enfermedades a través de la sangre colectada.
- Garantizar la seguridad transfusional, tamizando obligatoriamente los agentes infecciosos como son: VIH, virus Hepatitis B, virus Hepatitis C, Tripanosoma cruzi y Treponema pallidum.
- Participar en la evaluación externa de la calidad.
- Requerir la información estadística con oportunidad y fiabilidad de acuerdo con la calendarización establecida.

4. NIVEL LOCAL (Segundo y Primer nivel de complejidad)

- Procesar, analizar y emitir los resultados de las pruebas de VIH solicitadas y las referidas por otros establecimientos de salud, de acuerdo con la red establecida.

- Manejar y enviar semanalmente todas las muestras reactivas o indeterminadas al laboratorio de confirmación correspondiente y registrar la información en el formulario FVIH-01 (Anexo No. 2).
- Utilizar los controles de calidad para validar y respaldar los resultados y registrarlos en el protocolo de trabajo de pruebas VIH.
- Participar en los estudios de investigación de campo de vigilancia epidemiológica, en apoyo al Programa Nacional de ITS/VIH/sida.
- Participar en la evaluación externa de la calidad.
- Notificar al médico responsable del paciente, los resultados de pruebas realizadas por el establecimiento de salud y las confirmadas por el laboratorio de confirmación.
- Requerir la información estadística con oportunidad y fiabilidad de acuerdo con la calendarización establecida.

B. DESCRIPCIÓN DEL FLUJOGRAMA PARA EL DIAGNÓSTICO DE PRUEBAS VIH/sida

El proceso se inicia con la consejería y la información para la indicación de la prueba.

En el flujoograma diagnóstico se consideran cuatro tipos de usuarios:

1. PACIENTES QUE CONSULTAN POR OTRA PATOLOGÍA RELACIONADA CON VIH Y EMBARAZADAS SIGUEN LA MISMA RUTA DEL FLUJOGRAMA:

- Cuando el resultado inicial con prueba rápida VIH es no reactivo, se libera y se elabora el informe: **no reactivo a la fecha.**
- Cuando el resultado inicial con prueba rápida VIH es reactivo o indeterminado y existe sospecha de infección por VIH, se envía la muestra al Laboratorio de Confirmación de la Infección por VIH, acompañada de la solicitud con los datos, el laboratorio debe realizar ELISA de tercera generación; si el resultado de esta prueba es reactivo, se libera y se elabora el informe: **ELISA para VIH Positivo.**
- Si la prueba resulta no reactiva o indeterminada, el laboratorio debe realizar ELISA de cuarta generación, si resulta No reactivo, se libera y se elabora el informe: **ELISA para VIH Negativo.**

- Si el resultado es reactivo o indeterminado, el laboratorio debe enviar al Laboratorio Nacional de Referencia VIH, ubicado en la Unidad de Vigilancia Laboratorial del Ministerio de Salud, la muestra con el formulario respectivo (Anexo No. 3).
- El resultado positivo obtenido con Western Blot debe ser liberado y reportado de la siguiente manera: **Cumple con el criterio de positivo**.
- El resultado indeterminado o negativo por la prueba confirmatoria de Western Blot se reporta y el médico debe indicar la prueba de carga viral (Anexo No. 4).
- Cuando el resultado de la carga viral es **detectable**, se libera y se elabora informe.
- Si la carga viral es **indetectable**, se elabora informe y el médico debe investigar otras patologías no relacionadas con VIH.

2.- RECIÉN NACIDO

- Si la madre **no es positiva** a VIH, se debe seguir la ruta del flujograma de “otro paciente”.
- Cuando la madre es **positiva** se debe realizar prueba de ELISA VIH al recién nacido, si el resultado es **no reactivo**, se debe seguir la ruta del proceso de “otro paciente”.
- Si el resultado es **reactivo**, el médico debe dar seguimiento de acuerdo con los “Protocolos de Atención para Personas Viviendo con VIH/sida”, noviembre 2005.
- Cuando el resultado de la carga viral es **indetectable**, se debe liberar y elaborar el informe. En este caso el médico tratante debe dar seguimiento al recién nacido con prueba de ELISA.
- Si el resultado de la carga viral es **detectable**, de acuerdo con el protocolo de atención, el médico debe indicar la prueba de CD4/CD8 (Anexo No. 4).

3.- DONANTE DE SANGRE

- Se inicia con la realización de prueba de ELISA VIH 4ª generación, si el resultado que se obtiene es **no reactivo**, se debe elaborar el informe.
- Cuando el resultado de la prueba de ELISA de 4ª generación es **indeterminado o reactivo**, se debe realizar prueba de ELISA VIH de 3ª generación.
- Si el resultado de ELISA 3ª generación es **reactivo**, se debe elaborar el informe.
- Al obtener un resultado **no reactivo o indeterminado** con la prueba ELISA VIH 3ª generación, se procede a realizar la prueba de Western Blot.
- Si el resultado de Western Blot es **positivo**, se debe elaborar el informe.
- Si el resultado es **indeterminado o negativo**, por la prueba confirmativa de Western Blot, se

debe elaborar el reporte y notificar al médico tratante, quien debe indicar la prueba de carga viral VIH u otro estudio especial (ADN Proviral).

- Cuando el resultado de la carga viral es **detectable** a partículas virales, se elabora el informe.
- Si la carga viral es **indetectable**, también se debe elaborar el informe y el médico tratante debe investigar otras patologías no relacionadas con VIH.

Existen posibles resultados que ameritan la realización de una prueba de Western Blot, los cuales se detallan a continuación:

CUADRO RESUMEN DE RESULTADOS DE PRUEBAS DIAGNÓSTICAS DE VIH/SIDA

| item | Prueba Rápida | ELISA 3a G. | ELISA 4a G | Western Blot * |
|------|---------------|-------------|------------|----------------|
| 1 | - | NA | NA | NA |
| 2 | + | + | NA | NA |
| 3 | + | - | + | Realizar |
| 4 | + | ± | + | Realizar |
| 5 | + | ± | - | Realizar |
| 6 | + | - | - | NA |
| 7 | + | - | ± | Realizar |
| 8 | ± | + | + | NA |
| 9 | ± | + | - | Realizar |
| 10 | ± | + | ± | Realizar |
| 11 | ± | - | - | NA |
| 12 | ± | - | + | Realizar |
| 13 | ± | - | ± | Realizar |
| 14 | ± | ± | + | Realizar |
| 15 | ± | ± | - | Realizar |
| 16 | ± | ± | ± | Realizar |

Nota * Western Blot Positivo no necesariamente implica Seropositividad VIH
procede otros estudios complementarios
NA: No aplica.

Fuente: Comité Técnico que elaboró el presente Manual, año 2010.

C. CONTROL DE CALIDAD

Todos los laboratorios que realicen pruebas para determinar la presencia del VIH, deben realizar los procedimientos en la forma como se describen en este manual.

El control de calidad debe aplicarse en todos los laboratorios VIH, independientemente de su complejidad.

La aplicación del control de calidad efectivo permite a los laboratorios:

- Detectar tempranamente los errores.
- Mejorar la precisión y la exactitud.
- Usar en forma eficiente los recursos.
- Cumplir con requerimientos de inspección y certificación.
- Medir la productividad.

Para la evaluación de las pruebas serológicas deben considerarse los siguientes factores:

- Reproducibilidad
- Exactitud.
- Sensibilidad.
- Especificidad.
- Valor predictivo positivo.
- Valor predictivo negativo.

La sensibilidad de un set de diagnóstico está referida a la capacidad que tiene de detectar las muestras verdaderamente positivas y la especificidad a la capacidad de detectar las muestras verdaderamente negativas.

Una prueba será más sensible cuando presente menos resultados falsos negativos y más específicos cuando presente menos resultados falsos positivos.

Es importante señalar las dificultades de alcanzar una sensibilidad real del 100 %, en una infección en la que la seroconversión ocurre en un lapso de tiempo de dos a cuatro semanas en la mayoría de los casos y a veces, hasta varios meses (período ventana). Además, es importante mencionar la posibilidad de encontrar personas infectadas por el VIH que son seronegativos debido a causas orgánicas o defectos inmunes (falsos negativos).

Para tener el diagnóstico definitivo de un caso, debe confirmarse mediante una prueba en suero una vez se produce la seroconversión.

El control de calidad de los laboratorios clínicos y bancos de sangre se aplica en dos formas: control de calidad interno y control de calidad externo.

1. CONTROL DE CALIDAD INTERNO (CCI).

Nivel local (hospitales nacionales del 2º y 3er. nivel de complejidad) y LNR.

El control de calidad interno (CCI) tiene por objetivo asegurar el cumplimiento de todos los pasos establecidos en el procedimiento y además de validar la prueba permite identificar variaciones de lote a lote y detectar errores aleatorios o sistemáticos, ya que éstos tienen la misma composición de las muestras clínicas.

La variación de reactividad admitida para las muestras positivas, facilita la percepción de errores, que el control interno positivo del reactivo en uso no puede detectar, por lo que el control de calidad interno, se debe procesar de rutina en cada ensayo serológico y debe ser tratado como una muestra de paciente.

Para la validación de pruebas ELISA, se debe incluir obligatoriamente controles internos en todos los análisis serológicos, la cantidad por preparar va a depender de la frecuencia y el método con que cada institución realiza sus ensayos, esto con el fin de garantizar el volumen suficiente para la validación de los test.

Los controles internos positivos tienen vigencia de un año y se deben analizar cada vez que se realizan ensayos de VIH; no se debe descongelar ni utilizar las alícuotas más de una vez, pues este procedimiento puede ocasionar disminución de antígenos o anticuerpos presentes en la muestra y como consecuencia alterar el patrón de reactividad del control de calidad interno.

El resultado obtenido del control debe expresarse en forma gráfica, estableciendo el límite inferior, medio y superior. Si los puntos del control de calidad, están dentro de los límites de variación aceptables, la reacción es válida, (Gráfico del control de calidad interno CCI), los puntos deben estar lo más próximo a la media.

El distanciamiento de los puntos en relación con la media, es indicativo de problemas en los materiales, equipos o fallas en la ejecución de la prueba. El control de calidad interno (CCI) no puede ser utilizado para definir el punto de corte de la reacción o para evaluar las variaciones de sensibilidad.

Es importante considerar la discrepancia cuando alícuotas de un mismo control interno, presenten resultados reactivos y no reactivos; debe considerarse la posibilidad de que hayan

ocurrido fallas en el dispensado de la muestra, los lavados o inestabilidad en el desarrollo del ensayo, estos casos deben ser investigados para tomar las medidas correctivas.

La selección de las muestras, preparación, almacenamiento y uso de CCI requiere de procesos específicos. Tomando en cuenta que las muestras para la preparación del CCI deben presentar un valor de densidad óptica (D.O.) de 1.5 a 4.5 veces al valor del punto de corte del ELISA que se está utilizando, ya que es la zona de reactividad, que permite la detección de errores durante la realización de las pruebas.

Cada laboratorio clínico y banco de sangre que realiza pruebas de ELISA, debe preparar el control de calidad interno (CCI), ya que las condiciones de cada institución en relación con la metodología, equipo y reactivos son diferentes.

La preparación del CCI debe ser designada a un profesional de laboratorio responsable de todo el procedimiento que incluye el análisis, realización de gráficas de los resultados que se obtengan en cada ensayo, al igual que de los errores que se detecten, para que sean notificados y se realicen las acciones correctivas.

PROCEDIMIENTO CONTROL DE CALIDAD INTERNO (CCI)

OBTENCIÓN DE MUESTRAS POSITIVAS PARA PREPARAR CCI

Se utilizan muestras fuertemente positivas obtenidas en la rutina de trabajo, estas muestras tienen que ser analizadas en diluciones sucesivas hasta obtener una reactividad dentro de la zona ideal.

El diluyente por utilizar en la preparación del CCI, debe ser suero o plasma negativo obtenido de los bancos de sangre, para los cinco agentes infecciosos: VIH, HCV, HBsAg, *Tripanosoma cruzi* y *Treponema pallidum*.

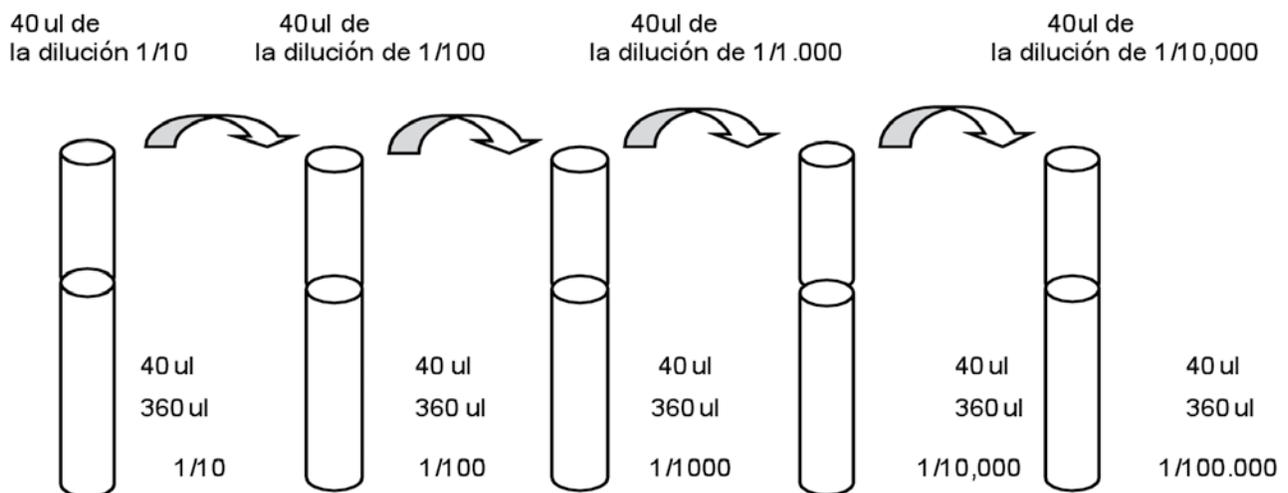
CLARIFICACIÓN DEL DILUYENTE

El suero o plasma negativo, se debe filtrar en papel filtro común, nitrocelulosa u otro sistema de filtración; no utilizar presión positiva debido al riesgo de accidentes. Luego conservarlo entre 2 a 8°C y debe ser utilizado en 48 horas como máximo para evitar contaminación.

PREPARACIÓN DE DILUCIONES DE LA MUESTRA POSITIVA PARA OBTENER LA REACTIVIDAD IDEAL

- Hacer una primera secuencia de diluciones de la muestra positiva en razón de 10 a partir de 1: para 10, se recomienda trabajar con un volumen mayor de 20 microlitros de la muestra positiva para evitar la posibilidad de error.

ESQUEMA DE DILUCIÓN IDEAL



Fuente: Protocolo de preparación de control de calidad. Hemocentro Sao Paulo, Brasil, 2003.

- Identificar los tubos y agitar para homogenizar cada dilución antes de hacer la siguiente y cambiar la punta para cada dispensación de muestra.
- Probar cada una de las diluciones con el reactivo en uso para el cual está preparando su CCI.
- Analizar los resultados obtenidos considerando las siguientes posibilidades:
 - El valor ideal de la densidad óptica está en cada una de las diluciones.
 - El valor ideal de la densidad óptica no fue encontrado en ninguna de las diluciones.
 - El valor ideal de la densidad óptica está entre dos diluciones. Para facilitar la comprensión del resultado de la densidad óptica se ejemplifica con la Tabla No. 1.

TABLA No. 1
TABLA DE RESULTADOS DE DENSIDADES ÓPTICAS

| TUBO | DILUCIÓN | <u>CASO 1</u> DO | <u>CASO 2</u> DO | <u>CASO 3</u> DO |
|------|-----------|------------------|------------------|------------------|
| 1 | 1/10 | 2.000 | 2.000 | 2.000 |
| 2 | 1/100 | 0.650 | 1.890 | 1.573 |
| 3 | 1/1,000 | 0.063 | 1.723 | 0.240 |
| 4 | 1/10,000 | 0.070 | 1.400 | 0.140 |
| 5 | 1/100,000 | 0.030 | 1.155 | 0.054 |

Fuente: Protocolo de preparación de control de calidad, Hemocentro Sao Paulo, Brasil, 2003.

Considerando que el punto de corte del ensayo es de 0.250 y que la densidad óptica ideal debe estar en la zona 0.375 y 1.125

CASO 1

- Si la densidad óptica ideal es 0.650 y está en la dilución 1/100, tubo No. 2. En este caso sólo faltaría calcular el volumen de la muestra positiva por ser utilizada en la preparación del CCI.

CASO 2

- Cuando el valor ideal de la densidad óptica no fue encontrado en ninguno de los tubos de las diluciones hechas, es preciso seleccionar una muestra y reiniciar la primera secuencia de diluciones.

CASO 3

- La densidad óptica ideal entre 1.573 y 0.240 que corresponden a las diluciones 1/100 y 1/1,000 (tubos 2 y 3). En este caso es preciso hacer diluciones intermedias a partir de la dilución de referencia(DR).

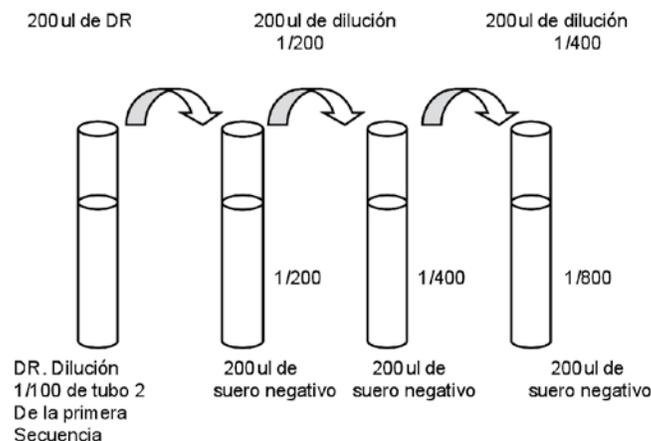
Se debe escoger como dilución de referencia la que tiene mayor densidad óptica de los dos tubos. Cuando se encuentre más de una dilución con densidad óptica dentro de la zona de reactividad ideal, escoger la que presente el menor valor.

Para efecto de hacer uso eficiente de los insumos y reactivos para la preparación del control interno en pruebas de ELISA de diferente principio, existe la posibilidad de obtener la misma dilución óptima para ambos métodos, se selecciona y se procede a la validación del CCI llevando registros individuales por cada metodología.

DILUCIONES INTERMEDIAS DE LA MUESTRA POSITIVA PARA OBTENER LA REACTIVIDAD IDEAL

- Hacer diluciones intermedias en razón de dos, a partir de la dilución de referencia.
- Pruebe cada una de las diluciones intermedias con el mismo reactivo en uso.

ESQUEMA DE DILUCIONES INTERMEDIAS



Fuente : Protocolo de preparación de Control de Calidad, Homocentro Sao Paulo, Brasil 2003.

No es necesario hacer diluciones intermedias si el valor ideal de la D.O. fue encontrado en uno de los tubos.

Es preciso utilizar una nueva muestra y reiniciar el proceso si el valor ideal de la D.O. no fue encontrado aún en la dilución 1/100,000.

CÁLCULO PARA OBTENER EL VOLUMEN DE MUESTRA POSITIVA PARA LA PREPARACIÓN DEL CCI

- Es necesario hacer una regla de tres simple, utilizando la dilución ideal de la muestra positiva y el volumen del diluyente (suero o plasma negativo).

1 ml de muestra positiva es para la dilución ideal como

x ml de muestra positiva es para el Volumen del CCI que deseamos preparar

$$x \text{ ml de muestra positiva} = \frac{\text{Volumen del CCI que deseamos preparar}}{\text{Dilución ideal}}$$

Volumen del diluyente = Volumen total del CCI que deseamos preparar – Volumen de muestra positiva.

- Después de la realización de los cálculos, proceder a lo siguiente:
- Identificar un frasco con el nombre del CCI preparado, éste debe tener capacidad mayor de tres veces al volumen total de CCI por ser preparado.
- Adicionar a este frasco el volumen de muestra positiva, luego el diluyente y colocar el tapón.
- Homogenizar el contenido mezclando suave y constantemente a temperatura ambiente durante 1-2 horas en rotador orbital o similar.

VALIDACIÓN DEL CCI

- Separar 16 alícuotas del CCI (1ml cada una).
- Probar las alícuotas en tres ensayos: seis en un primer ensayo, cinco en un segundo y cinco en un tercero. Los ensayos deben efectuarse el mismo día.
- Anotar el punto de corte y los resultados de cada ensayo en el formulario destinado para este fin, Registro de validación de resultados de CCI.
- Analizar los 16 resultados verificando si los valores de densidad óptica obtenidos, están dentro de la zona de reactividad recomendada o sea 1.5 a 4.5 veces el valor del punto de corte, se valida el ensayo procediendo a realizar los respectivos gráficos para luego preparar alícuotas.
- Si cualquiera de los resultados se encuentra fuera de la zona recomendada, el control no es válido, en este caso se debe homogenizar el CCI por lo menos una hora, separar cinco nuevas alícuotas y repetir el ensayo.
- Si los cinco valores de la densidad óptica de las alícuotas están dentro de los valores recomendados, el ensayo es validado
- Si en la repetición, cualquiera de los resultados estuviese nuevamente fuera del patrón establecido, descartar este CCI y preparar uno nuevo.

DISTRIBUCIÓN EN ALÍCUOTAS Y ALMACENAMIENTO DEL CCI

- Rotular los viales con la información de prueba:
 - Nombre de la prueba validada.
 - Número de lote.
 - Fecha de preparación.
- Homogenizar el CCI y distribuir en los viales.
- Almacenar en una caja de plástico resistente a la congelación y conservar a -20°C . Las etapas que comprende la preparación del CCI, deben realizarse como máximo en un tiempo de 48 horas y almacenarse a una temperatura entre 2 a 8°C , evitando la formación de espuma, ya que puede provocar degradación de proteínas.

VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS CON EL RESULTADO DEL CONTROL INTERNO POSITIVO

Para validar cada ensayo de rutina es preciso verificar si el valor de la razón de la densidad óptica del control de calidad y el punto de corte del ensayo (DO/CO), está dentro del rango aceptable. Para esto hacer uso del cuadro de registro de validación de resultados del CCI.

Se debe determinar la media, el límite superior y el límite inferior.

- Calcular la razón DO/CO, para cada una de las 16 alícuotas obtenidas en la validación y registrar los resultados en los campos correspondientes.
- Sumar los valores de la razón DO/CO de las 16 alícuotas y calcular la media.

$$\bar{X} \text{ de DO/CO} = \frac{\sum (\text{DO/CO})}{n}$$

\bar{X} de DO/CO = media de la razón de la densidad óptica de las 16 alícuotas.

$\sum (\text{DO/CO})$ = sumatoria de la razón DO/CO de las 16 alícuotas.

- Calcular los límites superior e inferior de variación aceptable para la razón DO/CO del control interno positivo en la rutina de los ensayos.
- n = número de alícuotas corridas en la validación.

$$\bar{X} (\text{DO/CO}) = \sum (\text{DO/CO})$$

$$\text{LÍMITE SUPERIOR} = \bar{X} + 25 \%$$

$$\text{LÍMITE INFERIOR} = \bar{X} - 25$$

REGISTRO DE VALIDACIÓN DE RESULTADOS DE CCI

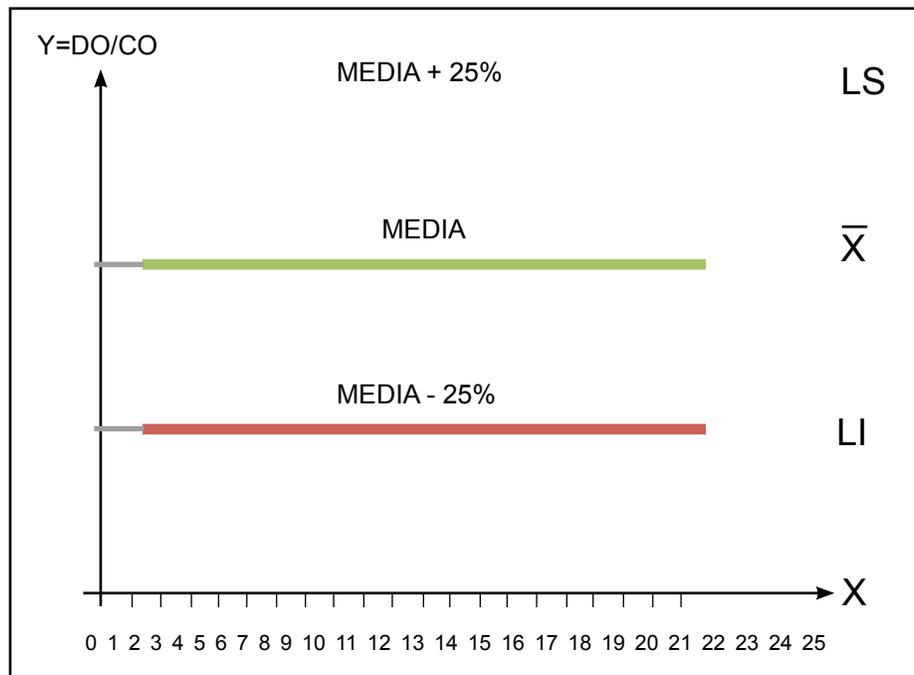
| METODOLOGÍA: _____ MARCA: _____ LOTE: _____ | | | |
|--|----------|----|----------|
| FECHA DE REALIZACIÓN _____ RESPONSABLE _____ | | | |
| REGISTRO DE RESULTADOS DE LOS ENSAYOS | | | |
| Ensayo _____ | ALÍCUOTA | DO | DO/CO |
| Corte _____ | 1 | | |
| 1.5 X CO = | 2 | | |
| 4.5 X CO = | 3 | | |
| Fecha _____ | 4 | | |
| | 5 | | |
| | 6 | | |
| Ensayo _____ | 7 | | |
| Corte _____ | 8 | | |
| 1.5 X CO = | 9 | | |
| 4.5 X CO = | 10 | | |
| Fecha _____ | 11 | | |
| Ensayo _____ | 12 | | |
| Corte _____ | 13 | | |
| 1.5 X CO = | 14 | | |
| 4.5 X CO = | 15 | | |
| Fecha _____ | 16 | | |
| | N= 16 | | ∑ DO/CO= |

Fuente: Protocolo de preparación de control de calidad, Hemocentro Sao Paulo Brasil, 2003.

CONSTRUCCIÓN DEL GRÁFICO PARA LA VALIDACION DEL CCI

- Trazar un gráfico a escala para los ejes horizontal y vertical.
- El eje horizontal **X** corresponde al número secuencial de alícuota del control de calidad interno utilizado.
- El eje vertical **Y** corresponde al valor de la razón DO/CO obtenida para el control de calidad interno.

- Trazar en el gráfico líneas paralelas al eje X en los puntos correspondientes a los valores de la media, límite superior y límite inferior.



Fuente: Protocolo de preparación de Control de Calidad, Hemocentro Sao Paulo Brasil, 2003.

- Ubicar en el gráfico los valores DO/CO del control de calidad interno, obtenidos en las 16 alícuotas procesadas.
- Para ensayos de rutina realizar un nuevo gráfico para ubicar las reactividades del CCI obtenidas cada tres ó seis meses, tomando en cuenta la frecuencia de los ensayos serológicos.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO PARA LAS PRUEBAS RÁPIDAS DE VIH

PROCEDIMIENTO:

- Utilizar unidades de plasma de reactividad conocida para la preparación de controles (positivo y negativo), con el propósito de disponer de un control de calidad de la prueba rápida VIH.

- Preparar los consumibles.
- Seleccionar los plasmas que cumplan los requisitos establecidos para la preparación de paneles.
- Realizar la prueba rápida y de ELISA, para comprobar la seropositividad o seronegatividad a los plasmas seleccionados.
- Identificar los frascos volumétricos: positivo a VIH y negativo a VIH.
- Filtrar los plasmas, tanto positivo como negativo en cada uno de los frascos ya identificados.
- Identificar los viales de la siguiente manera: fecha de preparación, nombre del agente y especificar si es control positivo o negativo.
- Envasar las muestras en viales ya identificados y congelarlos.
- Almacenar por un período máximo de un año.

2. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Los laboratorios clínicos y bancos de sangre de la red nacional, que realizan la prueba de VIH, deben participar en la evaluación externa de la calidad en pruebas serológicas, establecida por el Laboratorio Nacional de Referencia VIH y la sección de Banco de Sangre del área de Laboratorio Clínico de la Unidad de Vigilancia Laboratorial, la cual se realiza una vez al año y se hace con el propósito de evaluar la reproducibilidad de los resultados.

El proceso se inicia con la preparación de un panel de muestras, con resultados desconocidos para el laboratorio participante en la evaluación externa de la calidad. Las muestras son entregadas a los supervisores regionales para ser distribuidas a los participantes de la evaluación, los resultados obtenidos son enviados al Laboratorio Nacional de Referencia para ser analizados. Luego éste hace los informes individuales y confidenciales, los cuales son enviados a los participantes para autoevaluación, para aplicar las acciones correctivas y superar las discrepancias de los resultados.

PLANIFICACIÓN

El Laboratorio Nacional de Referencia debe realizar una vez al año, el envío de un panel de muestras de reactividad conocida de VIH, para ser procesadas por los laboratorios de la red nacional.

El listado de los laboratorios participantes debe ser proporcionado por los supervisores regionales.

El proceso de evaluación externa de la calidad, requiere de responsabilidades en los siguientes niveles: Laboratorio Nacional de Referencia, intermedio o regional y laboratorios locales participantes.

- El envío de materia prima al LNR para la preparación de los paneles, es responsabilidad de los jefes de banco de sangre de la red nacional.
- La preparación de los paneles y análisis de resultados, es responsabilidad del personal de la sección de VIH y del banco de sangre del LNR.
- El suministro de los materiales consumibles y papelería, es responsabilidad del personal de la sección de VIH del LNR.
- La entrega de paneles se realiza en el LNR a los supervisores regionales, para su distribución a los niveles locales.
- La recolección de resultados de la red nacional, es responsabilidad de los supervisores regionales.

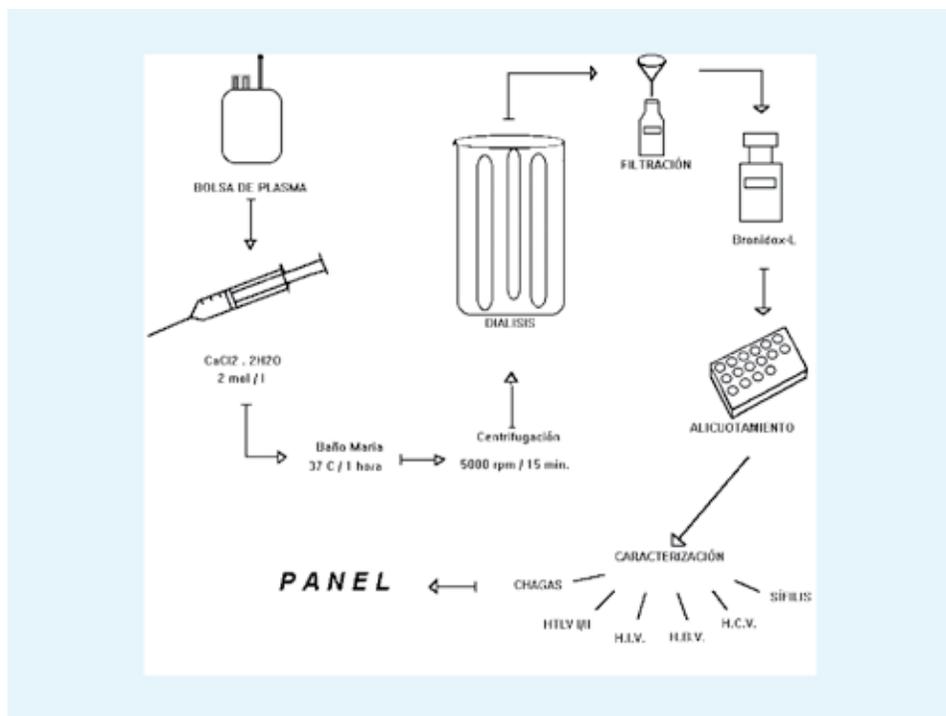
METODOLOGÍA

- Registrar los establecimientos participantes.
- Asignar la codificación interna de los establecimientos para garantizar confidencialidad.
- Solicitar la materia prima a los bancos de sangre, en el formato respectivo (Anexo No. 5).
- Seleccionar la materia prima haciendo uso del formato de registro de unidades de plasma, para la preparación del control de calidad externo e interno (Anexo No. 6).
- Analizar los paneles pre y posdiálisis.
- Preparar los paneles de acuerdo con las normas de bioseguridad.
- Distribuir los paneles.
- Recibir los resultados, por el personal responsable a cargo.
- Analizar e interpretar los resultados.
- Enviar los resultados para autoevaluación.
- Presentar los resultados a las jefaturas inmediatas.
- Efectuar el seguimiento al proceso de evaluación externa del control de calidad.

Las actividades descritas anteriormente, se deben realizar durante el transcurso del año en forma consecutiva y finalizar con una evaluación durante el último trimestre del año.

PROCEDIMIENTO

A CONTINUACIÓN SE DETALLAN LAS ETAPAS DEL PROCEDIMIENTO:



Fuente: Protocolo de preparación de control de calidad. Hemocentro Sao Paulo Brasil, 2003.

Recalcificación

- Las bolsas de plasma deben ser colocadas en forma individual en otra bolsa plástica y descongelar a temperatura ambiente o conservar a 4° C, dejándolas en el refrigerador durante una noche.
- Preparar una solución de Cloruro de Calcio hidratado 2 mol/l, (30 gramos de Cloruro de Calcio en 100 ml de agua destilada).
- Agregar 2.0 ml de esta solución a cada bolsa de plasma con una jeringa, cambiando la aguja cada vez que se trate de un nuevo marcador.
- Mezclar con movimientos giratorios suaves por un minuto en el momento que se agrega la solución de Cloruro de Calcio.

- Dejar las bolsas en baño maría a 30° C durante una a dos horas, manteniendo la temperatura, para la formación del coágulo. Durante la formación del coágulo, no mover las bolsas para evitar que se rompa.
- Dejar enfriar gradualmente a temperatura ambiente durante 30 minutos, una vez formado el coágulo.
- Colocar la bolsa de plasma a 4° C, en la refrigeradora y dejar así durante una noche.
- Rechazar las unidades de plasma que no formen fibrina.

Clarificación

El proceso de clarificación consiste en centrifugar las bolsas a una temperatura de 25° C, a 5000 r.p.m. durante 15 minutos, con el objetivo de retraer el coágulo. Después de la centrifugación, el coágulo formado en toda la extensión de la bolsa, se retrae formando un material aglomerado (pelet). Conservar las bolsas de plasma a 4° C, hasta que se inicie el proceso de diálisis.

Diálisis

- El procedimiento de diálisis se hace necesario para retirar el exceso de Cloruro de Calcio utilizado para la formación del coágulo.
- Lavar las membranas de diálisis.
- Hervir las membranas.
- Preparar la diálisis de los sueros.
- Usar materiales y vestimenta de bioseguridad (guantes, protector de cara, gabacha, alcohol de 70°).
- Cortar cuadrados de gasa para limpieza de las membranas.
- Cortar tiras de cordel delgado de aproximadamente 60 cm. de largo para identificar las membranas.
- Escribir el número de identificación de cada bolsa en una etiqueta adhesiva.
- Lavar las membranas internamente tres veces, con agua potable.
- Retirar el exceso de agua presionando con los dedos, en toda la extensión de la membrana.

Llenado de las membranas con suero

- Cortar un extremo de la tubuladura de la bolsa, colocarla dentro de la membrana de diá-

lisis y con la otra mano asegurar el material aglomerado o pelet, para no obstruir la salida de suero.

- Invertir la bolsa, permitiendo la salida de suero hacia la membrana de diálisis. Los sueros deben llenar la membrana hasta cinco cm. antes del extremo, para que se pueda hacer el nudo. Eliminar el excedente de burbujas de aire, comprimiendo de abajo hacia arriba con los dedos.
- Limpiar el extremo con gasa y luego hacer el nudo lo más cercano del extremo.
- Lavar la membrana con agua para luego secarla con gasa.
- Deslizar la membrana a la mitad, pasar la tira de cordel con la etiqueta de identificación, colocarla en uno de los extremos y hacer un nudo doble no apretado, dejando un espacio entre la membrana y el nudo, de manera que permita posteriormente cortar la tira sin cortar la membrana.
- Lavar las manos y las tijeras con bastante agua para continuar con la siguiente bolsa.
- Introducir hasta 13 membranas como máximo a una cubeta de 18 litros de solución salina 0.9 %, dejando la extremidad del cordel con etiqueta fuera de la solución.
- Cubrir el recipiente y levantar las tiras para colocarlas encima de la cubierta, con el fin de evitar que la solución fluya a través de ellas y prevenir la corrosión del sistema refrigerante y conservar el número y la identificación de la etiqueta.
- Realizar la diálisis con recambio de solución salina a 4° C cada cuatro horas, intercalando una noche de reposo.
- Utilizar membrana de celulosa que pueda retener la mayoría de las proteínas con peso molecular de 12,000 daltons o más.

Llenado de frascos con sueros dializados

- Retirar las membranas de las cubetas de diálisis.
- Lavar las membranas con agua.
- Secar con gasa toda la membrana, así como el extremo de ésta y las manos.
- Disponer de un frasco de 200 cc. sin tapadera, debidamente codificado y revisado, escribiendo en la parte superior de la etiqueta el marcador serológico.
- Cortar el extremo de la membrana lo más cercano al nudo.
- Verter el contenido de la membrana al frasco dejando el cuello libre, para evitar la expansión del suero durante el congelamiento.

Preservación

- Puede ser utilizado el Bronidox –L5 que presenta un aspecto viscoso y denso, por eso se debe depositar lentamente y mezclar con el suero.
- Identificar las viñetas de los frascos para el almacenamiento, con el número de bolsa y el marcador serológico, número de lote de producción, fecha de validación.
- Retirar las membranas y secar con gasa estéril.
- Cortar un extremo de la membrana y verter el contenido en el frasco previamente identificado.
- Agregar de 50 a 100 microlitros de Bronidox-L5 a cada frasco de suero, no agregar una cantidad mayor de 100 microlitros para evitar falsos positivos.
- Homogenizar la preparación con movimientos suaves de agitación.

Fraccionamiento en alícuotas

- Mezclar bien el frasco de almacenaje y retirar dos alícuotas de 2 ml en un vial, para hacer la caracterización.

Caracterización

- Analizar todas las muestras por lo menos con dos metodologías y tres marcas diferentes para los siguientes agentes: HBsAg, VIH, HCV, Chagas y Sífilis.
- Realizar ensayos complementarios de Western Blot para VIH, LIA para Hepatitis C, FTA-ABS para Sífilis y neutralización de anticuerpos para Hepatitis B.
- Determinar la cantidad de Calcio presente en los sueros dializados, mediante prueba bioquímica para verificar la eficacia de la diálisis.
- Los sueros con aspecto turbio, lipémico y con análisis no satisfactorio, son eliminados del panel.
- Aceptar los sueros que mantienen la reactividad, de lo contrario se rechazan.
- Homogenizar el frasco que contiene el suero dializado durante dos horas en un rotador a 92 rpm y luego distribuir.

Identificación, distribución y almacenamiento de alícuotas

- Rotular los viales de acuerdo con la clave establecida.
- Calcular el número de alícuotas de acuerdo con el volumen total del suero dializado.
- Distribuir en los viales con capacidad para 2 ml un volumen de 1.5 -1.8 ml de suero diali-

zado previamente homogenizado.

- Colocar dentro de una caja porta viales debidamente identificada.
- Envasar paneles en bolsas identificadas para cada establecimiento y colocar dentro de una bandeja plástica.
- Almacenar los paneles a una temperatura de 2-8 ° C, no más de 24 horas, previo a su entrega al nivel local.
- El supervisor de la región o del Programa Nacional de VIH, responsable de recibir estos paneles, debe hacer uso de un recipiente para mantener la cadena de frío mediante bolsas, frascos plásticos o geles de congelación.
- Guardar en el LNR un panel exactamente igual al que se envía a los niveles locales con fines de referencia y respaldo.
- Conservar los frascos de sueros dializados sobrantes a - 20° C. En estas condiciones los sueros tienen validez hasta dos años.
- Controlar el número de veces que los frascos de sueros son descongelados ya que debe ser hasta un número de 3.
- Preparar otras alícuotas en caso necesario y realizar los siguientes pasos:

Centrifugación

- Descongelar los frascos de sueros, colocando en bandejas con agua o a temperatura ambiente.
- Homogenizar durante una hora a 92 rpm.
- Centrifugar a 4000 rpm a 4° C durante 20 minutos.

Filtración

- Es opcional y puede hacerse con membranas de filtros de 0.2 micras para remover bacterias y hongos y retirar las partículas de fibrina; es aconsejable hacer una nueva filtración de los sueros, después de descongelarlos y antes de distribuirlos en los viales.
- Utilizar el panel haciendo alícuotas.

3. CONTROL DE CALIDAD EXTERNO INTERNACIONAL

- El LNR participa en evaluaciones externas con las siguientes instituciones:
- Hemocentro de Sao Paulo, Brasil.

- Laboratorio Regional de Referencia, Panamá.
- Colegio Americano de Patólogos, EE.UU.

El control de calidad externo internacional tiene como objetivo apoyar la mejora continua en los procedimientos técnicos, mediante la comparación de resultados de un panel desconocido entre laboratorios, con estándares de calidad conocidos.

PROCEDIMIENTO

Determinación de carga viral VIH:

Se reciben tres paneles en el año del Colegio Americano de Patólogos, conteniendo cinco muestras para ser procesadas en el LNR por el profesional responsable, quien realiza la prueba, analiza, interpreta, valida, elabora el informe y envía los resultados antes de la fecha límite que establece el Colegio.

El CAP envía por correo electrónico los resultados para autoevaluación. El LNR revisa los resultados, para verificar concordancia en dichos análisis.

Determinación de pruebas de anticuerpos contra VIH: ELISA y Western Blot.

Se reciben dos paneles de muestras en el año, procedentes del Hemocentro de Sao Paulo Brasil, conteniendo 24 muestras para ser procesadas en el LNR.

El tiempo para procesar el panel es de un mes después de haber recibido dichas muestras.

El profesional responsable en el LNR realiza las pruebas, analiza, interpreta, valida y elabora el informe de resultados.

La jefatura del área clínica, envía los resultados por correo electrónico y el siguiente día es enviada una hoja de resultados, que incluye la clave para autoevaluación. El LNR revisa los resultados, para verificar la concordancia con las muestras del panel. También se reciben dos paneles del Laboratorio Regional de Referencia VIH/sida, ubicado en Panamá, el cual contiene ocho muestras para ser procesadas. El tiempo para su procesamiento es de 30 días. Luego se reciben los resultados para que el LNR pueda ejecutar la autoevaluación y verificar la concordancia con las muestras del panel.

Control de Calidad de CD4-CD8:

El profesional responsable de esta prueba, realiza el control de calidad a través del análisis de un control de células de valores conocidos, proporcionado por la empresa proveedora; también mediante el uso de otros controles como: compensación de colores, estandarización, verificación de sistema óptico y fluido, estandarización de los voltajes de los tubos foto-multiplicadores y luego analiza, interpreta, valida y elabora informe de dichas pruebas.

D. CONDICIONES DEL LUGAR DE TRABAJO Y PERSONAL

1. LUGAR DE TRABAJO

El lugar donde se realicen las pruebas serológicas para la detección de anticuerpos VIH, debe poseer un área para cada una de las actividades: recepción de las muestras, separación del suero y realización del análisis; las condiciones ambientales deben ser óptimas para no invalidar los resultados o que se afecte negativamente la calidad requerida. Se debe prestar la debida atención al polvo, trastornos electromagnéticos, humedad, niveles de sonido, vibración causada por centrifugas.

Se debe utilizar símbolos que orienten sobre el peligro de contaminación biológica y tener accesibles los equipos básicos de protección colectiva e individual.

2. PERSONAL

El personal que realice pruebas para la detección de anticuerpos VIH, debe tener el debido entrenamiento para el desarrollo de su trabajo y tener conocimiento del riesgo en la manipulación de las muestras, para que puedan aplicar las medidas de bioseguridad correspondientes.

Se debe capacitar en forma permanente al personal de esta área, para eliminar los errores que ocurren por falta de actualización técnico-científica.

Cada vez que un nuevo método sea incorporado en la rutina diaria, es indispensable el entrenamiento de todo el personal involucrado.

E. EQUIPOS

Todos los equipos de laboratorio deben ser utilizados de manera correcta, para garantizar los resultados de los análisis.

Es importante considerar la actualización de la tecnología laboratorial y la vida útil de los equipos.

Los aspectos relevantes para asegurar el funcionamiento óptimo de los equipos son los siguientes: calibración y mantenimiento.

1. CALIBRACIÓN DE EQUIPOS

Los laboratorios VIH deben establecer y mantener procedimientos documentados para controlar, calibrar y mantener el equipo utilizado para inspeccionar, medir o examinar si un insumo satisface los requisitos establecidos. El equipo debe ser utilizado de tal manera que asegure que los límites en la medición son conocidos y consistentes con la capacidad de medida que se requiere.

La calibración se considera fundamental ya que la utilización de equipo no calibrado proporciona mediciones y respuestas erróneas, lo que genera graves consecuencias.

2. MANTENIMIENTO DE EQUIPO

Los laboratorios de VIH deben establecer el mantenimiento de equipo con un cronograma de trabajo, para que los equipos sean revisados y asegurar que están funcionando de acuerdo a las especificaciones técnicas. Al mismo tiempo deben incluirse medidas de conservación de vida útil, como es la limpieza, lubricación, calibración, cambio de empaques u otros dispositivos necesarios para su funcionamiento.

Se debe disponer de un plan de mantenimiento preventivo de los equipos, registro de problemas presentados y medidas correctivas realizadas.

A continuación se señalan los procedimientos de mantenimiento al equipo.

Diario:

1. Inspeccionar visualmente el encendido del equipo.
2. Anotar el registro de temperaturas de congeladores, refrigeradoras, baños de maría e incubadoras.
3. Limpiar el exterior de centrifugas, baños de maría, incubadoras, lectores y lavadores.
4. Detectar los ruidos y vibraciones inusuales de los aparatos y reportarlos.

Mensual: Limpiar y calibrar centrifugas, así como limpiar y lubricar pipetas automáticas.

Trimestral: Descongelar y limpiar internamente las refrigeradoras.

Semestral: Descongelar y limpiar internamente los congeladores. En el uso de los equipos de laboratorio se deben cumplir las recomendaciones de la casa fabricante y del proveedor, en lo relacionado a las acciones de mantenimiento, tales como revisiones periódicas de acuerdo con protocolos de trabajo.

F. DESCRIPCIÓN DE PROCESOS PREANALÍTICOS

1. SOLICITUD DE PRUEBA

- La actividad se inicia cuando el personal médico o de enfermería, llena la solicitud de las pruebas de diagnóstico para VIH, en los instrumentos específicos que sirven como fuentes de recolección de datos. Las pruebas de tamizaje y confirmación se indican en el Formulario FVIH 01.
- Para los análisis de seguimiento, carga viral VIH y CD4, se debe utilizar el formulario respectivo, los cuales son indicados por los médicos de las clínicas TAR.
- Todos los formularios de solicitud de prueba deben cumplir los siguientes requisitos: llenado completo en original, utilizar bolígrafo, letra legible, nombre, firma y sello del profesional solicitante y sello del establecimiento.

2. PREPARACIÓN DEL PACIENTE

- La actividad se continúa consultando al paciente si ya recibió la consejería, en caso de no haberla recibido, debe enviarse al paciente hacia el personal capacitado para realizar dicha actividad.

- El personal de laboratorio atiende al paciente, cumpliendo las siguientes recomendaciones: el paciente debe estar relajado, en un ambiente tranquilo, la persona que toma la muestra debe mostrar una actitud profesional, de confianza y seguridad.

3. CONTROL DE CALIDAD EN LA TOMA E IDENTIFICACIÓN DE LAS MUESTRAS

Los laboratorios y bancos de sangre que realizan la prueba diagnóstica del VIH deben supervisar los métodos y pautas de extracción, conservación y el tratamiento previo de las muestras. A este respecto, se debe destacar la importancia de una correcta identificación de los pacientes objeto del análisis y de la correspondiente muestra.

Todos los laboratorios que reciben y almacenan muestras para realizar determinaciones de anticuerpos VIH, deben cumplir el respectivo procedimiento para la toma e identificación de las muestras.

Se debe tener presente que, antes de la toma de la muestra para prueba diagnóstica de infección de VIH, debe darse la consejería respectiva.

Todas estas indicaciones, constituyen el primer paso para evitar errores en la ejecución de las pruebas.

El fin de este proceso, es garantizar la obtención de muestras confiables para realizar los análisis de VIH, de tal forma que se minimicen errores de tipo aleatorio y sistemáticos propios.

4. RECOLECCIÓN DE LA MUESTRA

- La muestra inicial que se toma al paciente para realizar el diagnóstico de VIH, debe ser colectada de preferencia en ayuno. El procedimiento de recolección de muestra para las pruebas de VIH, se describe en el "Manual de Procedimientos Técnicos de Laboratorio Clínico del Primer Nivel de Atención".
- Es importante señalar la correcta y cuidadosa identificación de los tubos que corresponden a los pacientes.

- El procedimiento de recolección de muestra para la realización de pruebas de seguimiento es responsabilidad de los profesionales del laboratorio de las Instituciones que administran la terapia Anti-retroviral TAR, la cual se detalla a continuación:
 - Para el conteo de linfocitos CD4-CD8 y carga viral VIH, la muestra debe ser sangre completa y recolectada en un tubo conteniendo solución de EDTA como anticoagulante y luego ser enviada al Laboratorio Nacional de Referencia VIH.
 - Para que los resultados de las pruebas rápidas de VIH en sangre sean confiables, la recolección de la muestra es un factor importante que hay que controlar.

MATERIAL

El material utilizado en el desarrollo de la recolección de muestras, debe ser exclusivo para esta finalidad y no debe ser empleado en otras determinaciones, a fin de disminuir la probabilidad de contaminación por fuentes externas.

Los materiales requeridos son los siguientes:

- Tubos plásticos de extracción de sangre al vacío de 5 ml de capacidad, sin anticoagulante.
- Tubos plásticos de extracción de sangre al vacío de 2, 3 ó 4 ml. de capacidad, con anticoagulante EDTA.
- Agujas con sistema de vacío descartables 21x 1 ½ mm.
- Adaptador o sujetador de plástico para los tubos al vacío.
- Torniquete o liga de hule flexible.
- Torundas de algodón estériles.
- Alcohol etílico al 70%.
- Recipiente para el desecho de materiales bioinfecciosos.
- Contenedores térmicos o hieleras con refrigerantes en su interior.
- Guantes no estériles descartables.
- Plumones marcadores resistentes a productos químicos.
- Gradillas para tubos.
- Bolsas rojas para descarte de material bioinfeccioso.
- Bolsas negras para basura común.

5. PROCEDIMIENTO PARA LA TOMA DE MUESTRA

- Verificar la identificación en el tubo: nombre y expediente deben coincidir con la solicitud.
- Colocar cómodamente al paciente.
- Solicitar al paciente que cierre el puño para que las venas resalten y sean más palpables.
- Seleccionar para la venopunción una de las siguientes venas: cefálica, basilíca o mediana del codo.
- Limpiar la zona de la punción con una torunda humedecida con alcohol etílico al 70%.
- Iniciar la limpieza en el punto de punción y se prosigue la limpieza hacia fuera siguiendo un movimiento de espiral.
- Aplicar un torniquete cuatro-cinco centímetros por encima de la zona de punción, no más de un minuto.
- Fijar la vena.
- Realizar la punción venosa para obtener como mínimo 5 ml de sangre.
- Cuando la sangre comience a fluir se libera el torniquete, una vez obtenida la muestra, hay que indicar al paciente que relaje el puño.
- Colocar suavemente una torunda de algodón estéril sobre el punto de punción y extraer la aguja.
- A continuación se ejerce presión sobre la zona, no aplicar masaje. Verificar el estado del paciente y la ausencia de sangramiento.

TOMA DE MUESTRA CON SISTEMA DE VACÍO

- Seleccionar la vena por puncionar.
- Asegurar la aguja al adaptador y no remover la capa protectora de la aguja.
- Realizar la asepsia en el área de la punción con algodón humedecido con alcohol al 70 % y no tocar el área desinfectada.
- Ajustar el torniquete.
- Remover el protector de la aguja y hacer la punción.
- Introducir en el soporte el tubo identificado, presionar hasta el límite.
- Soltar el torniquete hasta que la sangre comience a fluir en el tubo.
- Separar la aguja del soporte con auxilio de una pinza. Descartar la aguja en recipiente de boca ancha y paredes rígidas.
- Orientar al paciente a presionar con algodón la parte puncionada, colocando el brazo extendido.

- Ubicar el tubo en posición vertical con el tapón hacia arriba, en una gradilla después de obtener los 5 ml de sangre.

TOMA DE MUESTRA PARA GENOTIPIFICACION

La muestra se toma en el LNR, a pacientes seleccionados por el Comité de Farmacovigilancia del Programa Nacional de VIH.

La forma de colectarla es igual que el procedimiento para estudio de carga viral VIH y linfocitos CD4-CD8.

Este procedimiento de genotipificación, se somete a lineamientos especiales proporcionados por el LRR-VIH/sida que comprende:

- Realizar la toma de muestra.
- Centrifugar la muestra durante 15 minutos entre 1,000 a 2,000 rpm. a una temperatura de 15 a 25°C.
- Separar de manera estéril en una cámara de bioseguridad.
- Colocar la muestra en tres frío-viales libres de nucleasas, colocando 600 µl en cada uno, dos deben ser enviados al LRR-VIH/sida y uno debe ser almacenado en el LNR.
- Congelar la muestra de plasma de preferencia entre -65 a -80 °C hasta su envío, en caso de no ser enviada de inmediato al LRR-VIH/sida.
- Aplicar embalaje de acuerdo con la norma IATA en los envíos al exterior.
- El LRR-VIH/sida envía los resultados impresos vía aérea a la Dirección del Laboratorio Nacional de Referencia, responsable de hacerlos llegar al Programa.
- Los resultados vía correo electrónico, se envían de forma simultánea a la Jefatura del Laboratorio Central y al Programa Nacional VIH/sida.

6. TRANSPORTE DE LA MUESTRA

- Las muestras son potencialmente infecciosas y se deben tomar precauciones para reforzar la seguridad del operador de éstas y de otro personal, para no contaminar el exterior de los recipientes, ni el medio en que son transportadas.
- Las muestras para estudios de CD4-CD8 deben ser transportadas a temperatura ambien-

te, no excediendo los 37°C y deben ser procesadas en un máximo de 18 horas, después de obtenida la muestra.

- La sangre completa para carga viral VIH debe transportarse a temperatura de 2° a 8° C y procesarse dentro de las seis horas posteriores a la recolección. La cantidad de partículas virales medibles son más estables si la muestra conserva la cadena de frío y el tiempo estipulado para su envío; por lo que se deben transportar al laboratorio a la brevedad posible, en contenedores térmicos con sus respectivos refrigerantes.

7. CRITERIOS DE ACEPTACIÓN O RECHAZO DE MUESTRAS

Inicia con la colecta de acuerdo con los lineamientos establecidos para la toma, manejo y envío de muestras, para garantizar la confiabilidad, la calidad y exactitud de los resultados.

De la calidad de la muestra dependen en gran porcentaje los resultados que se van a obtener.

La Unidad de Vigilancia Laboratorial y el LNR han emitido los criterios técnicos por considerar para aceptar la muestra, son los siguientes:

Cantidad de muestra

- Carga Viral: 3 ml sangre completa con EDTA en paciente pediátrico y 4 ml sangre completa con EDTA en adultos.
CD4-CD8: 2ml. sangre completa con EDTA.
Confirmación VIH: 1 ml de suero.
- Identificación de muestras según los datos de la solicitud.
- Integridad del tubo y de la muestra.
- Transporte y conservación de las muestras de acuerdo con los lineamientos.
- Formulario de solicitud completo, con firma y sello del responsable.

Criterios de rechazo:

- Uso y condición del tubo, dañado o enviado en cubetas de equipo automatizado.
- Condición de tapón, deteriorado o de material inadecuado.
- Condición de la muestra, hemolizada, coagulada o insuficiente.

- Tubo o solicitud de examen contaminada con muestra.
- Llenado incompleto del formulario de solicitud de la prueba.

El lapso transcurrido entre toma y entrega de muestras para análisis de carga viral VIH al LNR, no debe exceder las seis horas, por requisito de la técnica utilizada. Además debe cumplirse el horario y días establecidos para cada tipo de análisis por realizar en la sección de VIH/sida.

Las muestras enviadas por el nivel local que no cumplan estos criterios, se registran en el formulario diseñado para tal efecto (Anexos Nos. 7 y 8) y se informa a los supervisores del Programa Nacional de VIH/sida, para su conocimiento y aplicar las medidas correctivas.

G. DESCRIPCIÓN DE PROCESOS ANALÍTICOS

1. CONTROL DE CALIDAD EN LA EJECUCIÓN DE LAS PRUEBAS ELISA.

Los procedimientos varían de acuerdo con el fabricante y el método empleado, pero en general se debe cumplir con lo siguiente:

- Leer correctamente las instrucciones en el inserto del conjunto diagnóstico antes de iniciar la ejecución de la prueba.
- Asegurar que todos los componentes, materiales y reactivos del conjunto diagnóstico, estén disponibles y preparar los insumos necesarios para la realización de la prueba.
- Utilizar agua destilada.
- Cumplir estrictamente las instrucciones de cada fabricante en la preparación de los buffer, reactivos, conjugados, sustratos y de las muestras (Anexo No. 9).
- Utilizar exactamente los volúmenes indicados.
- Cumplir el método seleccionado y no modificarlo en ninguno de los pasos.
- Cumplir el protocolo de trabajo (Anexo No. 10-A).
- Dejar que las muestras y los reactivos lleguen a temperatura ambiente antes de iniciar la prueba.
- Evitar la mezcla de reactivos de diferente conjunto diagnóstico.
- Utilizar reactivos con plazo de vencimiento vigente, no caducado.
- Verificar que los reactivos no presenten turbidez, precipitación o coloraciones alteradas.

- Cumplir los tiempos de incubación y las formas de agitación recomendadas en el método.
- Realizar periódicamente el mantenimiento preventivo de los equipos y la limpieza, de acuerdo con las indicaciones del fabricante.

Actualmente existen varios tipos de pruebas de laboratorio para la detección de anticuerpos contra el VIH en suero humano. La elección de la prueba o de la combinación de pruebas más conveniente depende de tres criterios:

- Objetivo de la prueba.
- Sensibilidad y la especificidad de las pruebas que se seleccionen.
- Prevalencia de la infección por VIH en la población en estudio.

La investigación de anticuerpos específicos contra el VIH es la metodología más ampliamente utilizada, para detectar a las personas infectadas por este virus.

Aunque la muestra que se puede analizar puede ser de diferente naturaleza, en la actualidad lo más frecuente es el empleo del suero o plasma obtenido de una extracción sanguínea.

Las técnicas relacionadas en los exámenes de detección del VIH actualmente pueden identificar:

- Anticuerpos VIH (ELISA, Pruebas rápidas, Western Blot, Pruebas de Inmunofluorescencia, aglutinación de partículas).
- Antígenos específicos del VIH (ELISA y Prueba de antígeno).
- Ácido nucleico viral del VIH (PCR u otra técnica).
- VIH por cultivo viral.

En nuestro país se realizan técnicas de ELISA, Pruebas rápidas sencillas, Western Blot, Reacción en Cadena de Polimerasa (PCR) para determinación de carga viral, Citometría de flujo para el conteo de linfocitos CD4- CD8.

A continuación se describen los métodos utilizados de acuerdo con los niveles de complejidad.

NIVEL LOCAL:

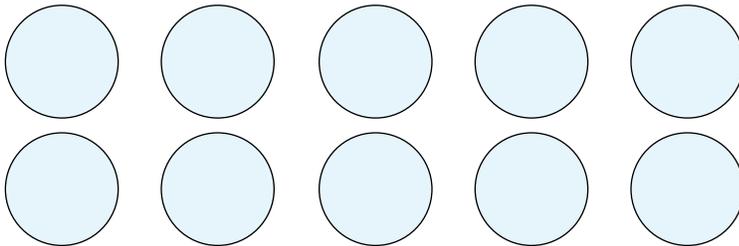
- a. Pruebas rápidas en hospitales y unidades de salud.
- b. Pruebas ELISA 3ª y 4ª generación en hospitales.

a. PRUEBAS RÁPIDAS

Estas pruebas suelen ser de fácil y rápida realización, por lo que el LNR de la Unidad de Vigilancia Laboratorial ha establecido que sea la prueba inicial para el diagnóstico de VIH/sida en todos los laboratorios de la red nacional de VIH, a excepción de los bancos de sangre que inician con ELISA de cuarta generación.

Todos los analistas de pruebas rápidas VIH, incluyendo las unidades móviles, deben utilizar sin excepción y en forma obligatoria el protocolo de trabajo conocido también como «Mapa», (anexo 10-B), para fines de ilustración se muestra una fracción del mismo:

Protocolo de Trabajo Prueba rápida VIH



Responsable: _____

Fecha de Realización: _____

Fecha de Vencimiento: _____

Lote: _____ Marca: _____

En los ensayos de prueba rápida VIH, se debe hacer uso de controles internos positivo y negativo, para asegurar que los resultados obtenidos sean confiables y válidos. Dichos controles son preparados y distribuidos por el LNR durante la primera semana de cada mes.

Cada Laboratorio VIH debe guardar evidencia del uso de estos controles, mediante el registro en el protocolo de trabajo y en los archivos de control.

Se debe realizar la técnica tal como se describe en el “Manual de Procedimientos Técnicos de Laboratorio Clínico del Primer Nivel de Atención”.

El LNR debe realizar estudios de validación de reactivos de pruebas rápidas y ELISA VIH, antes de su uso en los laboratorios de la red, para asegurar que cumplen con los criterios de sensibilidad y especificidad establecidos.

b . PRUEBAS ELISA 3ª y 4ª GENERACION

Características importantes por considerar en el control de calidad de las pruebas de ELISA.

- Los resultados serológicos están sujetos a variaciones que dependen tanto de la calidad de los reactivos como de los instrumentos de medición. El control de calidad tiene entre otros propósitos, además, controlar variaciones para dar resultados confiables.
- Los sueros seleccionados para preparar control de calidad VIH no deben ser lipémicos, turbios, ni presentar hemólisis. Se debe recolectar un volumen de 50 a 100 ml para preparar alícuotas y respaldar ensayos durante un año.
- Los ensayos de ELISA, deben incluir además de los controles del reactivo en uso, otros de reactividad conocida como el CCI (positivo débil) y deben quedar registrados en los protocolos de trabajo para evidencia y garantía de los resultados obtenidos. Los controles se deben procesar de igual manera que las muestras.
- Cuando los datos del control son graficados y el resultado no se encuentra en el rango establecido como aceptable, el técnico responsable debe investigar la causa, ya que el control representa cualquiera de las muestras que se están procesando. La causa puede ser que el control no haya cumplido condiciones de cadena de frío u otros como cambio del operador, deterioro de los reactivos o problemas técnicos del equipo.

Las pruebas ELISA de tercera y cuarta generación han mejorado en su preparación antigénica en cuanto a especificidad y sensibilidad, por lo cual son opciones como pruebas de confirmación, estas son utilizadas en los laboratorios de hospitales nacionales de segundo y tercer nivel de complejidad, bancos de sangre y LNR.

A pesar de que las pruebas de tamizaje son sensibles, la ausencia de anticuerpos contra el virus no descarta totalmente la infección viral, ya que durante la etapa temprana de la infección existe replicación viral, sin que haya una expresión serológica de los anticuerpos contra el VIH. Esta

etapa denominada "período de ventana" puede prolongarse por varias semanas y hasta meses. Las metodologías recomendadas a los laboratorios clínicos para la detección de la infección por VIH se detallan de la siguiente manera:

METODOLOGÍAS RECOMENDADAS POR NIVEL DE COMPLEJIDAD - AÑO 2010.

| NIVEL DEL LABORATORIO | MUESTRA CLÍNICA | ANÁLISIS | OBSERVACIONES |
|---|--------------------------|---|--|
| Laboratorio Nacional de Referencia VIH/sida | Suero o plasma | Pruebas rápidas, ELISA 3ª. y 4ª. generación. Western Blot. | <ul style="list-style-type: none"> • Diagnóstico. • Confirmación. • Resolución de discordancias. • Investigaciones clínicas. |
| | Sangre completa con EDTA | Conteo de linfocitos CD4-CD8: citometría de flujo. | Para pronóstico y seguimiento de la infección por VIH. |
| PCR: carga viral VIH. | | | |
| Laboratorios de Confirmación | Suero o plasma | Prueba Rápida, ELISA de Tercera y Cuarta generación, con equipo automatizado o semiautomatizado. | Hospitales Nacionales: Rosales, Maternidad, San Vicente, Santa Ana, Sonsonate, San Miguel. |
| NIVEL DEL LABORATORIO | MUESTRA CLÍNICA | ANÁLISIS | OBSERVACIONES |
| 3er. Nivel | Suero o plasma | Prueba rápida, ELISA de Tercera generación en casos de diagnóstico y Cuarta generación en donantes de sangre. | Hospitales nacionales especializados. |
| | Suero o plasma | Prueba rápida, ELISA tercera generación en casos de diagnóstico y cuarta generación en donantes de sangre. | Otros hospitales nacionales. |
| 1er. Nivel | Suero o plasma | Prueba rápida. | Unidades de salud. |

Fuente: Comité Técnico que elaboró el presente manual, 2010.

2. PROCEDIMIENTOS TÉCNICOS DE LAS PRUEBAS VIH QUE SE REALIZAN EN EL LABORATORIO NACIONAL DE REFERENCIA Y LABORATORIOS DE HOSPITALES NACIONALES

PRUEBA ELISA 3ª. GENERACIÓN (Anexo No. 11)

OBJETIVO ESPECÍFICO DE LA PRUEBA:

Identificar la presencia de anticuerpos VIH detectables en suero y plasma humanos, a través de ensayos inmunoenzimáticos.

POBLACIÓN BLANCO:

Muestras de pacientes referidas al laboratorio de confirmación.

PROCEDIMIENTO:

- Leer y analizar el inserto de la técnica por utilizar.
- Esperar que las muestras, reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente.
- Elaborar de forma obligatoria los protocolos o mapas de trabajo.
- Preparar el equipo.
- Verificar funcionamiento del equipo y la disponibilidad de insumos.
- Precalentar el equipo.
- Identificar copas de muestras y controles en orden correlativo.
- Transferir muestras y controles a copas.
- Verificar muestras y controles de calidad en el equipo, reactivos en relación con las muestras por procesar y calibración cuando sea necesario.
- Digitar información de solicitudes de examen en el equipo.
- Verificar datos registrados con muestras y señales de alarma del equipo.
- Colocar segmentos de muestras en zona de trabajo del equipo.
- Obtener impresión y lectura de resultados.
- Validar.
- Transcribir resultados en la solicitud del examen.
- Liberar reporte.
- Realizar ELISA de cuarta generación en caso de discordancia con el resultado del nivel local.
- Efectuar mantenimiento de equipo.

PERSONAL RESPONSABLE:

- Profesionales de laboratorio clínico debidamente capacitados.

PRUEBA ELISA 4ª. GENERACIÓN
Método automatizado (Anexo No. 12)

OBJETIVO:

Identificar la presencia de anticuerpos y antígenos VIH 1 y 2 detectables en plasma y suero humanos, a través de ensayos inmunoenzimáticos.

POBLACIÓN BLANCO:

Muestras de pacientes referidas al laboratorio de confirmación.

PROCEDIMIENTO:

- Leer y analizar el inserto de la técnica por utilizar.
- Esperar que las muestras, reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente.
- Elaborar mapa de trabajo.
- Preparar equipo.
- Verificar reactivos, puntas, desechos líquidos y sólidos.
- Rotular copas, solicitudes de examen y colocar viñetas con códigos de barra.
- Colocar muestras y controles en copas.
- Ingresar datos de solicitud en equipo.
- Validar e imprimir los resultados.
- Transcribir número correlativo a hoja de reporte de absorbancia.
- Transcribir resultado en la solicitud de examen.
- Liberar reporte si existe concordancia de resultado con el nivel local.
- En caso de discrepancia realizar Western Blot.
- Efectuar mantenimiento al equipo.

PERSONAL RESPONSABLE:

Profesionales de laboratorio clínico debidamente capacitados.

PRUEBA ELISA 4ª. GENERACIÓN

Método semiautomatizado (Anexo No. 13)

OBJETIVO:

Identificar la presencia de anticuerpos y antígenos VIH 1 y 2 detectables en plasma y suero humanos, a través de ensayos inmunoenzimáticos.

POBLACIÓN BLANCO:

Muestras de pacientes referidas al laboratorio de confirmación.

PROCEDIMIENTO:

- Leer y analizar el inserto de la técnica por utilizar.
- Esperar que las muestras, reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente.
- Elaborar mapa de trabajo.
- Preparar la placa de reacción.
- Agregar el diluyente para muestras y controles.
- Agregar las muestras y controles del reactivo en uso e internos.
- Incubar a 37 ° C durante una hora.
- Preparar el buffer.
- Preparar el sustrato.
- Lavar la placa seis veces.
- Secar la placa.
- Agregar 100 ul. de sustrato.
- Incubar a temperatura ambiente 30 min.
- Agregar 100 ul. de ácido sulfúrico.
- Programar el lector.
- Leer la placa.

PERSONAL RESPONSABLE:

Profesionales de laboratorio clínico debidamente capacitados.

NIVEL LNR:

- a. Western Blot.
- b. Carga viral VIH.
- c. Conteo de linfocitos CD4-CD8.

a. PRUEBA WESTERN BLOT (Anexo No. 14)

OBJETIVO:

Confirmar la presencia de anticuerpos específicos al Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH), a través de un ensayo inmuno-enzimático cualitativo.

POBLACIÓN BLANCO:

Muestras de pacientes con resultados discordantes, en los que no se pudo definir su reactividad con las otras pruebas establecidas.

PROCEDIMIENTO:

- Leer y analizar el inserto de la técnica por utilizar.
- Esperar a que las muestras, reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente.
- Elaborar el mapa de trabajo.
- Calcular el reactivo por utilizar.
- Preparar los reactivos.
- Preparar el equipo.
- Programar el equipo.
- Colocar las tiras e incubar.
- Agregar el buffer.
- Colocar las muestras, los controles e incubar.
- Lavar.
- Programar el lavado de bomba de conjugado.
- Dispensar de conjugado.
- Incubar durante una hora.
- Lavar la placa de muestras.
- Programar el lavado de bomba de sustrato.
- Incubar durante quince minutos.
- Lavar la placa de muestras.
- Secar las tiras.
- Efectuar el mantenimiento al equipo.
- Archivar las tiras.
- Leer las tiras comparando con el patrón estandarizado de reactivo en uso.

- Registrar en la hoja de reporte de Western Blot.
- Transcribir los resultados a la solicitud.
- Digitar en el programa computarizado.
- Imprimir el reporte.
- Firmar y sellar.
- Verificar los datos con la solicitud.
- Entregar los resultados.

PERSONAL RESPONSABLE:

Profesionales de laboratorio clínico debidamente capacitados.

b. PRUEBA DE CARGA VIRAL VIH (Anexo No. 15)

OBJETIVO:

Determinar en un paciente positivo a VIH, la cantidad actual de partículas virales circulantes en cada mililitro de sangre.

POBLACIÓN BLANCO:

Pacientes (VIH +) o hijos de madres (VIH +), que están recibiendo monitoreo de la evolución virológica de la infección, por el método de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR).

PROCEDIMIENTO:

- Leer y analizar el inserto de la técnica por utilizar.
- Limpieza y preparación de equipo durante una hora.
- Esperar que las muestras, reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente.
- Recibir las muestras.
- Asignar el número correlativo a las solicitudes de examen y muestras.
- Centrifugar las muestras.
- Identificar los viales.
- Transferir el plasma a cada vial.

PRIMER ENSAYO

- Elaboración del mapa de trabajo.
- Imprimir el mapa de trabajo.

- Colocar las muestras y controles en gradillas de muestras de acuerdo al mapa de trabajo.
- Colocar la gradilla con las muestras y controles en equipo de extracción de material genético.
- Amplificar y detectar las partículas virales.

SEGUNDO ENSAYO

- Elaboración del mapa de trabajo.
- Imprimir el mapa de trabajo.
- Segundo montaje de 24 muestras.
- Colocar las muestras y controles en gradilla de muestras de acuerdo al mapa de trabajo.
- Colocar la gradilla con las muestras y controles en equipo de extracción de material genético.
- Amplificar y detectar las partículas virales.
- Digitar los datos.
- Analizar, interpretar y validar los resultados.
- Transferencia de los resultados entre programas del equipo analizador.
- Imprimir el informe de resultados.
- Firmar y sellar el reporte.
- Transcribir los resultados en el reverso de la solicitud de examen.
- Entregar los resultados a recepción.

PERSONAL RESPONSABLE:

Profesionales de laboratorio clínico debidamente capacitados.

c. PRUEBA DE CONTEO DE LINFOCITOS CD4 y CD8 (Anexo No. 16)

OBJETIVO:

Evaluar el estado inmune de los pacientes con sospecha de desarrollar deficiencias inmunológicas congénitas o adquiridas como Inmunodeficiencia Combinada Severa (IDCS) y el Síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA).

POBLACIÓN BLANCO:

Pacientes con o sin terapia antirretroviral como parámetro celular, asociado más cercanamente a la progresión de la enfermedad por VIH y pronóstico del paciente, por medio de la

tecnología de citometría de flujo que se tienen en uso como alternativas, de acuerdo a la disponibilidad de reactivo.

METODOLOGÍA No. 1:

Citómetro de flujo con histograma

- Recibir las muestras.
- Identificar las muestras.
- Esperar que las muestras, reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente.
- Preparar las muestras.
- Lisar las muestras.
- Realizar el mantenimiento preventivo al equipo, diariamente.
- Introducir, procesar y validar los controles de calidad del equipo.
- Crear la lista de trabajo.
- Agregar el reactivo de calibración del equipo.
- Leer las muestras.
- Imprimir los resultados.
- Firmar y sellar los resultados.
- Transcribir los resultados en la solicitud de examen.
- Entrega de los resultados a la recepción.

METODOLOGÍA No. 2

Citómetro de flujo sin histograma

- Recibir las muestras.
- Identificar las muestras.
- Esperar que las muestras, reactivos y controles alcancen la temperatura ambiente.
- Mezclar las muestras.
- Identificar con número de muestra, el par de reactivos.
- Agregar la muestra al par de reactivos.
- Incubar las muestras de una a dos horas protegidos de la luz.
- Agregar el reactivo de fijación.
- Realizar el mantenimiento preventivo al equipo.

- Leer las muestras.
- Elaborar el reporte.
- Firmar y sellar el reporte.
- Transcribir los resultados en la solicitud de examen.
- Entregar los resultados a recepción.
- Realizar el mantenimiento preventivo al equipo.

PERSONAL RESPONSABLE:

Profesionales de laboratorio clínico debidamente capacitados.

H. DESCRIPCIÓN DE PROCESOS POSTANALÍTICOS

1. CONTROL DE CALIDAD EN LA EMISIÓN DE RESULTADOS

Los resultados impresos son la evidencia escrita, por medio de los cuales se comprueba la realización de las pruebas. La documentación de respaldo para un laboratorio es la siguiente:

- Manuales de calidad.
- Manuales de procedimientos técnicos.
- Procedimientos operacionales estándares.
- Formularios.
- Registros de datos.
- Protocolos de análisis.
- Instructivos.
- Informes.

Existen razones por las que se debe documentar:

- Comprobar que los procedimientos se realizaron en la forma estipulada.
- Verificar que diferentes personas realicen los procedimientos de la misma manera.
- Facilitar el entrenamiento del personal de laboratorio.
- Trazabilidad del proceso para identificar dónde ocurrió el problema y corregirlo.

2. PROCEDIMIENTOS POSTANALÍTICOS.

Los procedimientos postanalíticos, se realizan después de haber examinado el espécimen. Se detallan a continuación:

a. REVISIÓN SISTEMÁTICA DE RESULTADOS

Con la mayoría de pruebas de VIH se determinan los anticuerpos que el organismo crea contra el virus. El tiempo para producir anticuerpos, que se puedan detectar en un análisis, puede variar de persona a persona. Un determinado porcentaje de personas desarrollan anticuerpos detectables, dentro de las siguientes dos a ocho semanas posteriores a la exposición con el virus. Con algunas pruebas se reduce el período de ventana, investigando antígenos y anticuerpos a través de pruebas de ELISA de cuarta generación.

Existe el riesgo de que algunas personas tomen más tiempo en desarrollar los anticuerpos detectables; por esta razón, cuando la prueba inicial del VIH es negativa y es efectuada dentro de los tres primeros meses, después de un posible contacto, se debe realizar una segunda prueba a los seis meses, para descartar una posible exposición al virus.

Se entiende como resultado de las pruebas de VIH, al producto final del procedimiento realizado con las diferentes metodologías, que identifican anticuerpos o antígenos contra el virus, en la que se incluyen la interpretación, verificación e impresión de los resultados.

El resultado de cada análisis por el laboratorio o banco de sangre, debe reportarse de forma precisa, clara, objetiva, sin ambigüedad, en idioma castellano, en el formato implementado en cada Institución e incluir toda la información necesaria.

b. INTERPRETACIÓN Y VERIFICACIÓN PARA EMISIÓN DE REPORTE DE RESULTADOS

Antes de entregar el resultado del análisis al paciente, se le debe dar la posconsejería, por el profesional capacitado para este proceso y anotarlo en el Registro de Consejería Pre y Postprueba de VIH.

Los resultados de las pruebas rápidas pueden ser: No Reactivo, Reactivo e Indeterminado.

- Cuando el resultado es no reactivo se procede a elaborar el informe, en el que la prueba se reporta, **no reactivo a la fecha.**

- Cuando el resultado de la primera prueba es **reactivo o indeterminado**, debe enviarse la muestra al laboratorio de confirmación. Cada muestra debe ir acompañada de la solicitud de prueba confirmatoria con sus respectivos datos.
- Los resultados de las pruebas rápidas, se interpretan de forma visual.
- Las pruebas de confirmación se interpretan de acuerdo al inserto de la técnica.

c. IMPRESIÓN DE RESULTADOS

Los resultados deben ser entregados a la persona que está autorizada según normativa del MSPAS con base en la «Guía para la Consejería Previa y Posterior a la Prueba VIH-sida».

Los resultados deben ser confidenciales, por lo tanto no deben entregarse a otra persona, ni informar resultados por vía telefónica.

Cuando se solicite copia del resultado, debe señalarse en el reporte que se trata de una copia y colocar la fecha de emisión del resultado original.

El profesional que realiza el análisis debe revisar resultados, firmar y sellar reportes antes de remitir el reporte final y anotar en el libro de registro diario.

El laboratorio del nivel local debe registrar los datos de las muestras enviadas a confirmación y los resultados obtenidos por el laboratorio de confirmación.

d. INFORME Y TRANSFERENCIA DE RESULTADOS

El informe de los resultados de la prueba rápida debe reportarse en el formulario establecido, FVIH-01B, el cual consta de un original y dos copias. La hoja blanca original se entrega al archivo para ser colocada en el expediente del paciente, la copia rosada se debe enviar al digitador y la copia celeste aplica para muestras **reactivas o indeterminadas**, la cual se envía al laboratorio de confirmación.

El formulario FVIH-01 consta de dos partes, la parte superior es entregada semanal o diariamente al digitador, para ingresar todos los datos al sistema de información, si es un caso **reactivo** debe ser enviada al digitador en las próximas 24 a 48 horas. La parte inferior se entrega

al paciente, para solicitar la prueba de VIH en el laboratorio, el resultado del análisis debe anotarse en la parte posterior del formulario, el cual es entregado por el médico o personal capacitado al paciente en la posconsejería.

Para uniformidad de datos estadísticos, el Programa Nacional ITS/VIH/sida recomienda a todas las instituciones adoptar el uso de estos formularios.

I. BIOSEGURIDAD

A partir de la aparición de la epidemia del SIDA, se ha planteado la necesidad de poner en práctica las medidas de bioseguridad en todo laboratorio, en el que habitualmente se trabaja con materiales biológicos de distinta índole.

El riesgo de infección por el VIH en el laboratorio radica principalmente en la contaminación de manos, mucosas oculares, nasales y bucales con sangre y otros fluidos orgánicos infectados.

Esta contaminación ocurre por lesión abierta, causada en el acto o en forma previa, por objetos cortopunzantes, salpicaduras o diseminación de materiales infectados. No hay evidencia que el VIH sea transmitido por vía aerógena.

La seguridad en el laboratorio es de interés para todos los involucrados, quienes deben practicar las medidas de bioseguridad enfocadas a la prevención, es importante sensibilizar y capacitar al personal de laboratorio al respecto.

El personal tiene el deber de notificar al jefe inmediato cualquier práctica incorrecta, pues los errores pueden afectar la seguridad e higiene ocupacional.

Los jefes de laboratorio, encargados de gestión de calidad y supervisores, son los responsables de vigilar que el personal involucrado sea debidamente capacitado sobre las medidas de bioseguridad y vigilar continuamente su cumplimiento.

IV. REVISIÓN Y ACTUALIZACIÓN

El presente Manual, debe ser revisado y actualizado por un equipo técnico multidisciplinario cada tres años o cuando por los avances tecnológicos y científicos, lo ameriten.

V. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, CONACYT, norma técnica para el manejo de los desechos bioinfecciosos, primera actualización, El Salvador, C.A., mayo 2008.
2. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Manual de control de calidad en los laboratorios VIH. El Salvador, C.A. abril 2005.
3. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Guía para la elaboración de documentos regulatorios. El Salvador, C. A. marzo 2007.
4. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Guía para el sistema de información de la profilaxis postexposición al VIH. SIPPE. El Salvador, C.A. agosto, 2003.
5. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Protocolos de atención para personas viviendo con VIH/sida, El Salvador C. A. noviembre 2005.
6. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guía de bioseguridad para los laboratorios clínicos, El Salvador, C.A. octubre 2008.
7. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social. Unidad de Laboratorio Central "Dr. Max Bloch". Programa Nacional de ITS/VIH/SIDA. Manual para control de calidad en los laboratorios VIH. Primera edición. San Salvador, El Salvador.
8. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Estándares de trabajo en banco de sangre. El Salvador, C.A. 2007.
9. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Manual de procedimientos de bioseguridad para los laboratorios clínicos. 2ª. edición El Salvador, diciembre 2008.
10. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guía de bioseguridad para los laboratorios clínicos. 1ª. edición El Salvador, diciembre 2008.

11. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, "Manual de procedimientos técnicos de laboratorio clínico del primer nivel de atención, Agosto 2007".
12. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guía de práctica clínica para el buen uso de la sangre, sus componentes y derivados. 1ª edición, El Salvador, noviembre 2008.
13. Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social, Guía toma, manejo y envío de muestras carga viral VIH y linfocitos CD4. 3ª edición, El Salvador, marzo 2005.
14. Organización Mundial de la Salud, OMS/OPS, Manual de mantenimiento para equipo de laboratorio, Washington, D.C., EE.UU. 2005. Organización Mundial de la Salud, OMS/OPS. Manual de bioseguridad en el Laboratorio, 3ª edición, Ginebra, Suiza, 2005.
15. Organización Mundial de la Salud, OMS/OPS, Cabinas de seguridad biológica, uso, desinfección y mantenimiento, 1ª edición, El Salvador, C.A., agosto 2002.
16. Organización Mundial de la Salud, OMS/OPS, Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. Febrero, 1994.
17. Organización Mundial de la Salud, OMS/OPS, Guía para un manual de sistemas de calidad en un laboratorio de prueba. Ginebra 1998.
18. Richmond Jonathan Y., Ph. D; McKinney Robert W., Ph. D., Bioseguridad en laboratorios de microbiología y biomedicina, Centro de control y prevención de enfermedades CDC/NIH, 4ª edición, Atlanta, Georgia, EE.UU.
19. Taller internacional para Centroamérica y el Caribe: Control interno en bancos de sangre y validación. Diciembre: 2003, San Salvador, El Salvador.

VI. GLOSARIO

ABSORBANCIA: Término usado en química analítica y que es proporcional al grosor de una muestra y a la concentración de la sustancia en ésta.

AEROSOL: Es el residuo de gotas ya secas que pueden permanecer suspendidas en el aire durante largos períodos.

ALÍCUOTA: Pertenece a una porción del total de una muestra.

ATEMPERAR: Llevar muestras o reactivos a la temperatura ambiente.

BRONIDOX-L5: Preservativo que evita contaminación de hongos o bacterias.

CALIBRACIÓN: Actividad que normalmente comprende la verificación, el ajuste y la estandarización de la información que brinda un instrumento.

CARACTERIZACIÓN: Determinación de los anticuerpos o antígenos, para cada uno de los agentes infecciosos presentes en cada suero o plasma.

CARGA VIRAL: Es la medida de la cantidad circulante del VIH y se encuentra en relación directa con la replicación viral. Es el mejor parámetro disponible para evaluar la respuesta o falla al tratamiento, el pronóstico de la progresión y el riesgo de transmisión del VIH de la madre al feto.

CONCORDANCIA: Obtener igual puntuación o igual resultado.

CONFORMIDAD: Cumplimiento de un requisito.

DALTONS: Es la más pequeña unidad de masa usada para expresar masas atómicas y masas moleculares. Equivale a la duodécima (1/12) parte de la masa de un átomo de carbono 12.

DENSIDAD ÓPTICA: Es la absorción de un elemento óptico, por unidad de distancia para una longitud de onda dada.

DISCORDANCIA: Contrariedad, desacuerdo o disconformidad con un resultado.

ENSAYO: Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.

ERROR: Resulta de la pérdida de precisión y exactitud, puede ocurrir en cualquier momento y lugar.

ERROR ALEATORIO: Error que no se puede predecir y que no ocurre en forma regular.

ERROR SISTEMÁTICO: Error inherente al sistema de la prueba o la metodología.

EVIDENCIA: Registros, declaraciones de hechos o cualquier otra información y que son verificables.

GLICOPROTEÍNA: Proteína que contiene hidratos de carbono.

INFORME DE ANÁLISIS: Documento que contiene los resultados de los análisis y cualquier otra información pertinente a la prueba.

LIBERAR RESULTADO: se establece en flujograma diagnóstico de VIH, que al obtener dos pruebas reactivas de diferente metodología, el resultado por liberar es positivo a VIH.

LINFOCITOS CD4: Es uno de los marcadores indirectos de la sangre total más utilizado en el seguimiento clínico de las personas con infección por VIH, ya que son útiles tanto en el inicio de tratamiento con antirretrovirales, como en la profilaxis de infecciones oportunistas. El conteo normal de células CD4 oscila entre 500 y 1,500 células por milímetro cúbico.

LINFOCITOS CD8: Las células CD8 también llamadas T-supresoras tienen el rol de combatir infecciones virales tales como el VIH; un adulto sano generalmente tiene entre 150 y 1,000 células CD8 por milímetro cúbico de sangre.

MARCADOR: Anticuerpo o anti-anticuerpo conjugado para identificar, antígenos o anticuerpos específicos presentes en el suero o plasma.

MEDIDA CORRECTIVA: Acción tomada para eliminar la causa de una no conformidad detectada u otra situación indeseable.

PELET: Porciones pequeñas de material aglomerado o comprimido.

PÉPTIDO SINTÉTICO: Elaborados a partir de la porción estructural y no estructural del virus, para reducir al mínimo la incidencia de reacciones no específicas que resultan de las reactividades cruzadas.

PERIODO DE VENTANA: Período que transcurre entre la infección de un individuo y el momento en que presenta en sangre anticuerpos detectables por las pruebas de tamizaje.

POLIMERASA: Cualquier enzima que cataliza una polimerización, como la de nucleótidos a polinucleótidos.

POOL: Mezcla de más de un componente sanguíneo de iguales características y provenientes de diferentes donadores.

POZO: Porción o agujero de una placa de ELISA, donde se coloca muestra para análisis.

PRUEBAS DE TERCERA GENERACIÓN: Son aquellas que utilizan péptidos y proteínas recombinantes del VIH. Detectan anticuerpos.

PRUEBAS DE CUARTA GENERACIÓN: Son aquellas que se basan en la detección simultánea de anticuerpos y complejos inmunes antígeno P24/Anticuerpo y tienen una alta sensibilidad y especificidad.

RAZÓN: Valor obtenido de la división de una cantidad por otra, del mismo tipo.

RECOMBINANTE: Intercambio de partes cromosómicas entre diferentes cepas microbianas.

RELATORIO: Documento que narra y explica.

REQUISITO: Necesidad o expectativa establecida, generalmente implícita u obligatoria.

SEROREVERSIÓN: Cuando un niño no está infectado y los anticuerpos positivos contra el VIH se negativizan después de los 18 meses de edad y no hay evidencia clínica y de laboratorio de infección.

TAMIZAJE: Estrategia aplicada sobre una población para detectar una enfermedad en individuos sin signos o síntomas de esa enfermedad. La intención es identificar enfermedades de manera temprana dentro de una comunidad.

TRAZABILIDAD: Capacidad para seguir la historia, la aplicación o la localización de todo aquello que está bajo consideración.

VALIDACIÓN: Es la acción de probar que un procedimiento, proceso, sistema, equipo o método usado en la producción o control de un producto funciona de acuerdo con lo esperado y logra el resultado propuesto.

VALIDEZ: Grado en el cual una medida realmente detecta lo que se supone que debe medir.

WESTERN BLOT: Prueba específica de VIH, ya que la muestra se hace reaccionar con proteínas y glicoproteínas específicas del VIH, separados por electroforesis en gel e inmovilizadas por adhesión, sobre tiras de nitrocelulosa. Está indicado para pacientes con resultados dudosos.

ZONA IDEAL: Absorbancia óptima que deben leer las muestras, establecida por el protocolo del CCI, el cual considera un valor mínimo y un máximo de acuerdo al corte.

VII. ABREVIATURAS Y SIGLAS

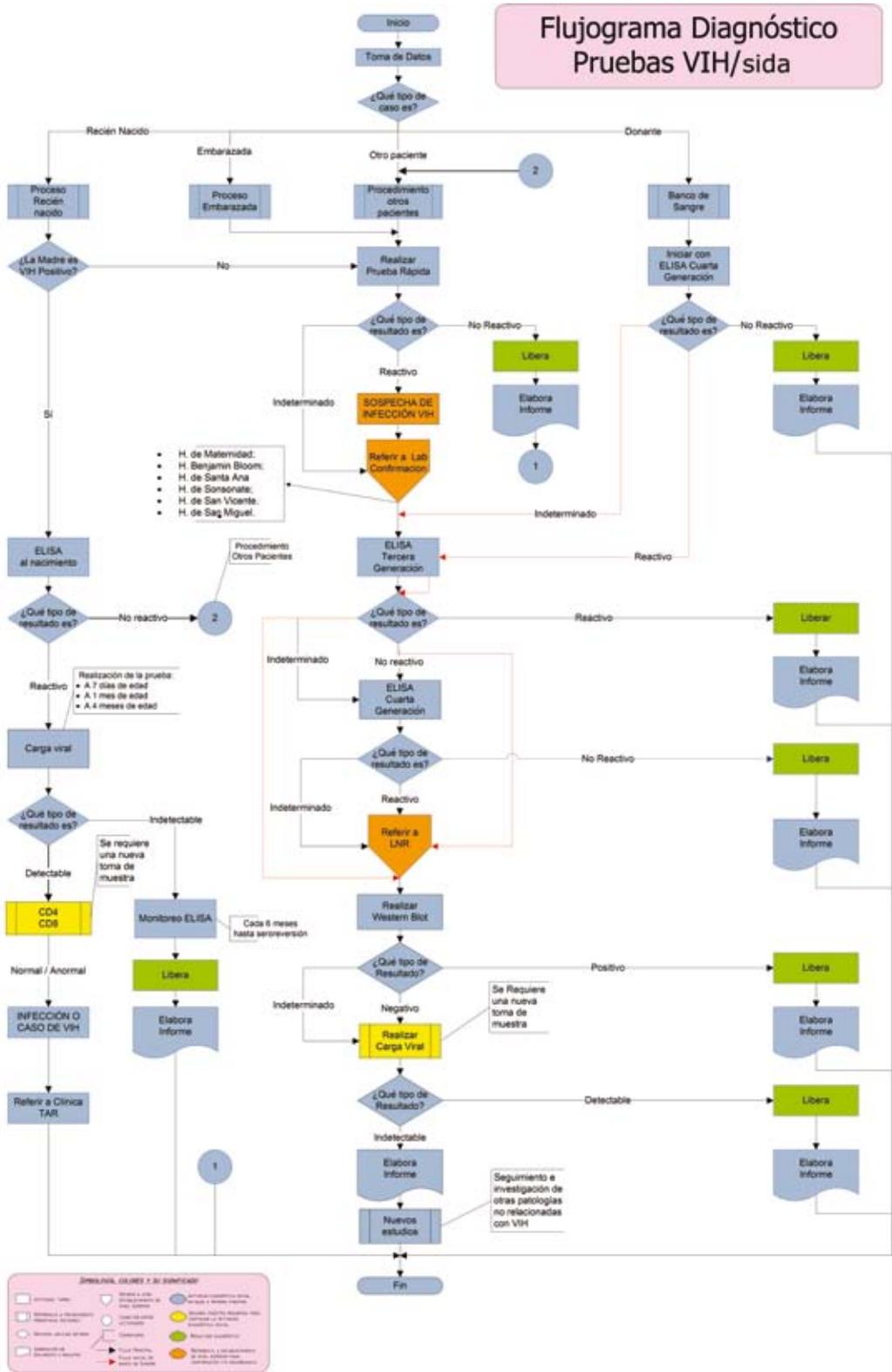
| | |
|----------------------|--|
| CAP: | Colegio de Patólogos Americanos. |
| CLÍNICA TAR: | Clínica médica donde se presta atención integral al paciente VIH y la indicación de medicamentos antirretrovirales a las personas que lo requieren. |
| CCI: | Control de Calidad Interno. |
| CUT-OFF: | Valor de punto de corte en el método de ELISA. |
| DO: | Densidad óptica. |
| DO / CO: | Densidad óptica / Corte. |
| DR: | Dilución de referencia. |
| EDTA: | Ácido etilendiaminotetracético. |
| ELISA: | “Enzyme Linked Immuno sorbent Assay” por sus siglas en inglés que significan Ensayo Inmuno-Enzimático. |
| FTA-ABS: | “Fluorescent treponemal antibody absorption test” por sus siglas en inglés que significan prueba de absorción de anticuerpos treponémicos fluorescentes. |
| HBsAg: | Antígeno australiano del Virus de la Hepatitis B. |
| HCV: | Virus Hepatitis C. |
| ITS/VIH/sida: | Infecciones de transmisión sexual y VIH/sida. |
| LIA: | Inmunoensayo en tira. |
| LI: | Límite inferior. |
| LS: | Límite superior. |

- LNR:** Laboratorio Nacional de Referencia de VIH de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.
- LRR VIH/sida:** Laboratorio Regional de Referencia VIH/sida.
- MSPAS:** Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social.
- OMS:** Organización Mundial de la Salud.
- PCR:** Reacción en cadena de la Polimerasa.
- PFC:** Plasma fresco congelado.
- PNS:** Programa Nacional de ITS /VIH/sida.
- TAR:** Terapia Antirretroviral
- VIH:** Virus de Inmunodeficiencia Humana

VIII. ANEXOS

ANEXO 1

Flujograma Diagnóstico Pruebas VIH/sida



Fuente : Comité Técnico que elaboró el presente Manual, Año 2010.

| Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social República de El Salvador Formulario para solicitud y confirmación de VIH (FVIH-01) | | Ministerio de Salud EL SALVADOR |
|--|---|--|
| A. DATOS GENERALES | | |
| Fecha de consulta: ___ / ___ / ___ | | Nombre del Establecimiento: _____ |
| (dd / mm / aa) | | |
| No. Expediente/No. de Afiliación: _____ | Categoría de Afiliación: <input type="checkbox"/> Colizante <input type="checkbox"/> Pensionado <input type="checkbox"/> Beneficiario <input type="checkbox"/> Hijo | |
| I. DATOS DE IDENTIFICACIÓN | | |
| No. DUI: _____ | | Fecha de nacimiento: (dd / mm / aa) _____ / _____ / _____ |
| Apellidos: _____ | | Edad: _____ |
| Nombres: _____ | | Años _____ Meses _____ Días _____ |
| | | Sexo: Masc. <input type="checkbox"/> Fem. <input type="checkbox"/> |
| Si es menor de edad, nombre completo de madre o responsable: _____ | | |
| Dirección Completa: _____ | | Área: <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/> Rural |
| Municipio: _____ | Departamento: _____ | Nacionalidad: _____ |
| | | Teléfono: _____ |
| Estado Civil 1. Soltero (a) <input type="checkbox"/> 2. Casado (a) <input type="checkbox"/> 3. Divorciado (a) <input type="checkbox"/> 4. Viudo (a) <input type="checkbox"/> 5. Acompañado (a) <input type="checkbox"/> 6. Separado (a) <input type="checkbox"/> | | Occupación 1. Desempleado (a) <input type="checkbox"/> 2. Ama de casa <input type="checkbox"/> 3. Estudiante <input type="checkbox"/> 4. Jubilado / Pensionado <input type="checkbox"/> 5. Empleado informal <input type="checkbox"/> 6. Empleado formal <input type="checkbox"/> 11. Especifique: _____ |
| Número de hijos: _____ Alfabeta: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | | 7. Agricultor/Obrero <input type="checkbox"/> 8. Comerciante <input type="checkbox"/> 9. Cuerpos uniformados <input type="checkbox"/> 10. No aplica <input type="checkbox"/> 11. Otro <input type="checkbox"/> |
| II. DATOS ESPECÍFICOS DE MUJERES EN EDAD REPRODUCTIVA (10 - 49 AÑOS) | | |
| Indagar en toda mujer en edad reproductiva (10 a 49 años de edad) | | |
| Embarazada: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | | Semanas de amenorrea: _____ |
| FUM: ___ / ___ / ___ | FPP: ___ / ___ / ___ | |
| Fórmula Obstétrica G <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> P <input type="checkbox"/> A <input type="checkbox"/> V <input type="checkbox"/> | | |
| Período de indicación de examen a) Primer Trimestre <input type="checkbox"/> b) Segundo Trimestre <input type="checkbox"/> c) Tercer Trimestre <input type="checkbox"/> d) Durante Trabajo <input type="checkbox"/> e) Post Parto <input type="checkbox"/> de Parto <input type="checkbox"/> | | |
| En control Prenatal: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | | |
| Nombre de responsable de indicar prueba: _____ | | |
| Firma y Sello: _____ | | |
| III. DATOS ESPECÍFICOS SOBRE FACTORES DE RIESGO | | |
| Orientación Sexual | | |
| 1. Heterosexual <input type="checkbox"/> 2. Bisexual <input type="checkbox"/> 3. Homosexual <input type="checkbox"/> | | |
| Otros Posibles Factores de Riesgo | | |
| 1. Usos de Drogas Inyectables <input type="checkbox"/> 2. Trabajador (a) Sexual <input type="checkbox"/> 3. Hombre que tiene Sexo con Hombre <input type="checkbox"/> 4. Privado de Libertad <input type="checkbox"/> 5. Población Móvil <input type="checkbox"/> 6. Receptor Transfusión y/o Hemoderivados <input type="checkbox"/> 7. Hijo de Madre VIH (+) <input type="checkbox"/> 8. Contacto de Persona VIH (+) <input type="checkbox"/> 9. Tatajes <input type="checkbox"/> 10. Más de una pareja sexual en el último año <input type="checkbox"/> 11. Relaciones sexuales fuera de su pareja habitual sin protección <input type="checkbox"/> 12. Otro <input type="checkbox"/> Especifique: _____ | | |
| IV. DATOS SOBRE SOLICITUD Y MOTIVOS DE EXAMEN | | |
| Indicación de examen para (DC): 1. Infección VIH <input type="checkbox"/> 2. Caso SIDA <input type="checkbox"/> 3. Transmisión Vertical <input type="checkbox"/> | | |
| Motivo de solicitud de Examen: 1. Donante <input type="checkbox"/> 2. Inscripción Prenatal <input type="checkbox"/> 3. Control Prenatal <input type="checkbox"/> 4. Exposición Perinatal <input type="checkbox"/> 5. Accidente Laboral <input type="checkbox"/> 6. Abuso Sexual <input type="checkbox"/> 7. Paciente con Tuberculosis <input type="checkbox"/> 8. Otras ITS <input type="checkbox"/> 9. Tamizaje <input type="checkbox"/> 10. Contacto <input type="checkbox"/> 11. Solicitud Voluntaria <input type="checkbox"/> 12. Solicitud de Trabajo <input type="checkbox"/> 13. Otro <input type="checkbox"/> Especifique: _____ | | |
| V. DATOS CLÍNICOS | | |
| Clínica: <input type="checkbox"/> | | Manejo: <input type="checkbox"/> |
| Asintomático <input type="checkbox"/> | | Ambulatorio <input type="checkbox"/> |
| Sintomático <input type="checkbox"/> | | Hospitalario <input type="checkbox"/> |
| VI. CONSEJERÍA | | |
| Se brindó consejería: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | | |
| Esta hoja deberá ser llenada en forma completa y con letra legible por personal que indicó la prueba de VIH | | |
| Ley y Reglamento de Prevención y Control de la Infección Provocada por el Virus de Inmunodeficiencia Humana DECRETO No. 588. CAPITULO III. Vigilancia Epidemiológica Art. 30. Y DECRETO No. 40 CAPITULO IV. Art. 59. Art. 61 | | |
| ORDEN DE SOLICITUD DE EXAMEN | | |
| Establecimiento: _____ | | DUI: _____ |
| Apellidos: _____ | | No. Expediente/No. de Afiliación: _____ |
| Nombres: _____ | | |
| Edad: _____ Sexo: _____ | | |
| Motivo de solicitud de Examen: 1 Donante <input type="checkbox"/> 2 Inscripción Prenatal <input type="checkbox"/> 3 Control Prenatal <input type="checkbox"/> 4 Exposición Perinatal <input type="checkbox"/> 5 Accidente Laboral <input type="checkbox"/> 6 Abuso Sexual <input type="checkbox"/> 7 Paciente con TB <input type="checkbox"/> 8 Otras ITS <input type="checkbox"/> 9 Tamizaje <input type="checkbox"/> 10 Contacto <input type="checkbox"/> 11 Solicitud Voluntaria <input type="checkbox"/> 12 Solicitud de Trabajo <input type="checkbox"/> 13 Otro <input type="checkbox"/> | | |
| Nombre de responsable de indicar prueba: _____ | | Firma y Sello: _____ |

| B. EXÁMENES QUE FUNDAMENTAN EL DIAGNÓSTICO | | Uso Exclusivo de Laboratorio |
|---|--|------------------------------|
| Nombre del Establecimiento que realiza la prueba: _____ | | |
| Fecha de toma de muestra: _____ Fecha de realización: _____ Fecha de resultado: _____ | | |
| Prueba Rápida <input type="checkbox"/> Marca _____ Reactiva <input type="checkbox"/> No Reactiva <input type="checkbox"/> Indeterminada <input type="checkbox"/> ELISA <input type="checkbox"/> Marca _____ Lectura _____ Reactiva <input type="checkbox"/> No Reactiva <input type="checkbox"/> Indeterminada <input type="checkbox"/> | | |
| Responsable: _____ | | |
| ELISA para confirmación Establecimiento: _____ Fecha recepción: _____ Fecha de realización: _____ Fecha de resultado: _____ Marca: _____ Lectura: _____ Resultado: Reactivo <input type="checkbox"/> No reactivo <input type="checkbox"/> Indeterminado <input type="checkbox"/> Responsable: _____ | ELISA para confirmación Establecimiento: _____ Fecha recepción: _____ Fecha de realización: _____ Fecha de resultado: _____ Marca: _____ Lectura: _____ Resultado: Reactivo <input type="checkbox"/> No reactivo <input type="checkbox"/> Indeterminado <input type="checkbox"/> Responsable: _____ | |
| WESTERN BLOT Nombre del Establecimiento que confirma prueba: _____ Fecha de recepción de muestra: _____ Fecha de realización: _____ Fecha de resultado: _____ Resultado: Positivo <input type="checkbox"/> Negativo <input type="checkbox"/> Indeterminado <input type="checkbox"/> Responsable: _____ | | |
| C. DIAGNÓSTICO FINAL DE CASO Clasificación final de Caso (se completará esta información con los resultados de laboratorio que confirma muestra y cuadro clínico de paciente) 1. Negativo <input type="checkbox"/> 2. Infección por VIH <input type="checkbox"/> 3. Caso SIDA <input type="checkbox"/> 4. Seguimiento <input type="checkbox"/> 5. Caso Conocido <input type="checkbox"/> | | |
| | | |
| EXÁMENES QUE FUNDAMENTAN EL DIAGNÓSTICO Nombre del Establecimiento que realiza la prueba: _____ Fecha de toma de muestra: _____ Fecha de realización: _____ Fecha de resultado: _____ Prueba Rápida <input type="checkbox"/> Marca _____ Reactiva <input type="checkbox"/> No Reactiva <input type="checkbox"/> Indeterminada <input type="checkbox"/> ELISA <input type="checkbox"/> Marca _____ Lectura _____ Reactiva <input type="checkbox"/> No Reactiva <input type="checkbox"/> Indeterminada <input type="checkbox"/> Responsable: _____ | | |

Ministerio de Salud Pública y Asistencia Social
República de El Salvador



(FVIH-01) B. EXÁMENES QUE FUNDAMENTAN EL DIAGNÓSTICO Uso Exclusivo de Laboratorio

Complemento Formulario para solicitud y confirmación de VIH(FVIH-01)

Establecimiento: _____

Apellidos: _____ DUI: _____

Nombres: _____ No. de Expediente/No. de Afiliación: _____

Edad: _____ Sexo: _____

Nombre del Establecimiento que realiza la prueba:

Fecha de toma de muestra: _____

Fecha de realización: _____

Fecha de resultado: _____

Prueba rápida: Marca _____ Reactiva No Reactiva Indeterminada

ELISA Marca _____ Lectura _____
Reactiva No Reactiva Indeterminada

Responsable: _____

Laboratorio a que se refiere: _____

ELISA para confirmación

Establecimiento: _____

Fecha recepción: _____ Fecha de realización: _____

Fecha de resultado: _____

Marca _____ Lectura _____

Resultado: Reactiva No Reactiva Indeterminada

Responsable: _____

Laboratorio a que se refiere la muestra: _____

ELISA para confirmación

Establecimiento: _____

Fecha recepción: _____ Fecha de realización: _____

Fecha de resultado: _____

Marca _____ Lectura _____

Resultado: Reactiva No Reactiva Indeterminada

Responsable: _____

Laboratorio a que se refiere la muestra: _____

Original: Expediente/Paciente

Duplicado: Centro de Acopio/Digitador

Triplicado: Laboratorio de Referencia / Aplica para muestras reactivas o indeterminadas

ANEXO 3

ANEXO 4

Formulario para solicitud de Carga Viral y CD4 (FVIH-04)

Ministerio de Salud
República de El Salvador
Formulario para solicitud de Carga Viral y CD4(FVIH-04)



Fecha: ___/___/___ (dd / mm / aa) Nombre del Establecimiento: _____
 No. Expediente/Afilación: _____

| | |
|--|--|
| No. DUI: _____ Fecha de nacimiento: (dd/mm/aa) _____ Apellidos: _____ Edad: Años _____ Mes _____ Días _____ Nombres: _____ Sexo: Masc <input type="checkbox"/> Fem <input type="checkbox"/> | |
| Si es menor de edad, nombre completo de madre o responsable: _____ No. DUI de la madre: _____ No. Expediente de la madre: _____ | |
| Dirección Completa: _____ | |
| Municipio: _____ Departamento: _____ | |
| Tipo de Muestra: Basal <input type="checkbox"/> Control <input type="checkbox"/> | |
| En TAR: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> | |
| Fecha de inicio de TAR: ___/___/___ | |
| Tipo de TAR: Nucleosido <input type="checkbox"/> No Nucleosido <input type="checkbox"/> Otros <input type="checkbox"/> | |
| Examen solicitado: Carga Viral <input type="checkbox"/> Estándar <input type="checkbox"/> Ultrasensible <input type="checkbox"/> | |
| CD 4 _____ | |
| Área: Urbana <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Nacionalidad: _____ Teléfono: _____ | |
| RECIÉN NACIDO (completar si corresponde) Hijo de madre VIH (+): Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Fecha de Parto ___/___/___ Parto múltiple: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Madre llevó Control Prenatal: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> RN recibió TAR: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Tipo de Parto: Cesárea <input type="checkbox"/> Vaginal <input type="checkbox"/> Establecimiento que atendió el parto: _____ | |
| MUJER GESTANTE O POST PARTO (completar si corresponde) Gestante VIH (+) conocida: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Con TAR Previo a embarazo: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> En Control Prenatal: Si <input type="checkbox"/> No <input type="checkbox"/> Establecimiento donde lleva(o) el Control Prenatal: _____ Periodo de inicio TAR: _____ Durante el embarazo <input type="checkbox"/> Durante trabajo de parto <input type="checkbox"/> Post Parto <input type="checkbox"/> Semanas de gestación cuando inició TAR: _____ | |

Nombre del Médico Responsable _____ Firma y Sello _____
 Este formulario deberá ser llenado en forma completa y con letra legible por personal que indicó el examen

Formulario para solicitud de Carga Viral y CD4 (FVIH-04).

ANEXO 5



SOLICITUD DE MATERIA PRIMA A BANCOS DE SANGRE, AÑO 2005



Fecha _____

Lic. _____

Jefe Banco de Sangre

Hospital Nacional _____

Presente.

Por este medio solicitamos su valiosa colaboración para obtener bolsas de plasmas con reactividad conocida, los cuales serán utilizados en la producción de paneles de suero para control de calidad externo e interno, adjunto enviamos planilla de registro para control de bolsas de plasma donde debe anotar la información solicitada.

Para obtener controles de calidad óptimos y aprovechar al máximo los plasmas que ustedes nos proporcionan, **es necesario que cumplan los siguientes requisitos:**

- Volumen mínimo 200 ml en cada bolsa de plasma.
- Libre de hemólisis.
- Sin lipemia.
- Sin fibrina.
- De fecha lo más reciente posible, de no ser así, no menor de tres meses de colectado.
- Haber estado congelado en forma establecida desde la colecta.
- Que las tubuladuras de las bolsas no sean cortas.
- Llenado de registro de unidades de plasma en forma completa.
- Cantidad mínima solicitada de plasmas para cada agente = 10 Plasmas reactivos de cada uno (Chagas, Sífilis, VIH, Hepatitis B y C,) y 10 plasmas no reactivos.
- Los plasmas positivos enviados deben ser de alta reactividad

NO ENVIAR PLASMAS QUE NO CUMPLAN CON ESTOS REQUISITOS

Fuente: Sección Banco de Sangre de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

UNIDAD DE VIGILANCIA LABORATORIAL
AREA CLÍNICA SECCIÓN DE VIH/SIDA

FORMULARIO DE MUESTRAS RECHAZADAS

ESTABLECIMIENTO _____ REGIÓN _____ HORA DE RECHAZO: _____

NOMBRE DEL PACIENTE _____ EDAD _____ N° EXPEDIENTE _____ FECHA: _____

MARCAR CON "X" EN LA CASILLA CORRESPONDIENTE A LA PRUEBA.

| PRUEBAS | | | | | |
|--|-------------|-------------------|-----------|------------------|---------------|
| CAUSA | CARGA VIRAL | LINFOCITO CD4-CD8 | ELISA VIH | WESTERN BLOT VIH | OBSERVACIONES |
| MUESTRA INADECUADA * | | | | | |
| MUESTRA MAL IDENTIFICADA | | | | | |
| SOLICITUD DE EXAMEN INCOMPLETA | | | | | |
| TRANSPORTE DE MUESTRA CON TEMPERATURA INADECUADA | | | | | |
| TUBO O SOLICITUD CONTAMINADA CON MUESTRA | | | | | |
| HORA DE RECIBO EXTEMPORANEO | | | | | |
| EMBALAJE INADECUADO | | | | | |

* Muestra insuficiente, coagulada, otros: Escribir la causa de la observación.

Nombre del Responsable: _____ Firma _____ Sello _____

UNIDAD DE VIGILANCIA LABORATORIAL
AREA CLÍNICA SECCIÓN DE VIH/SIDA

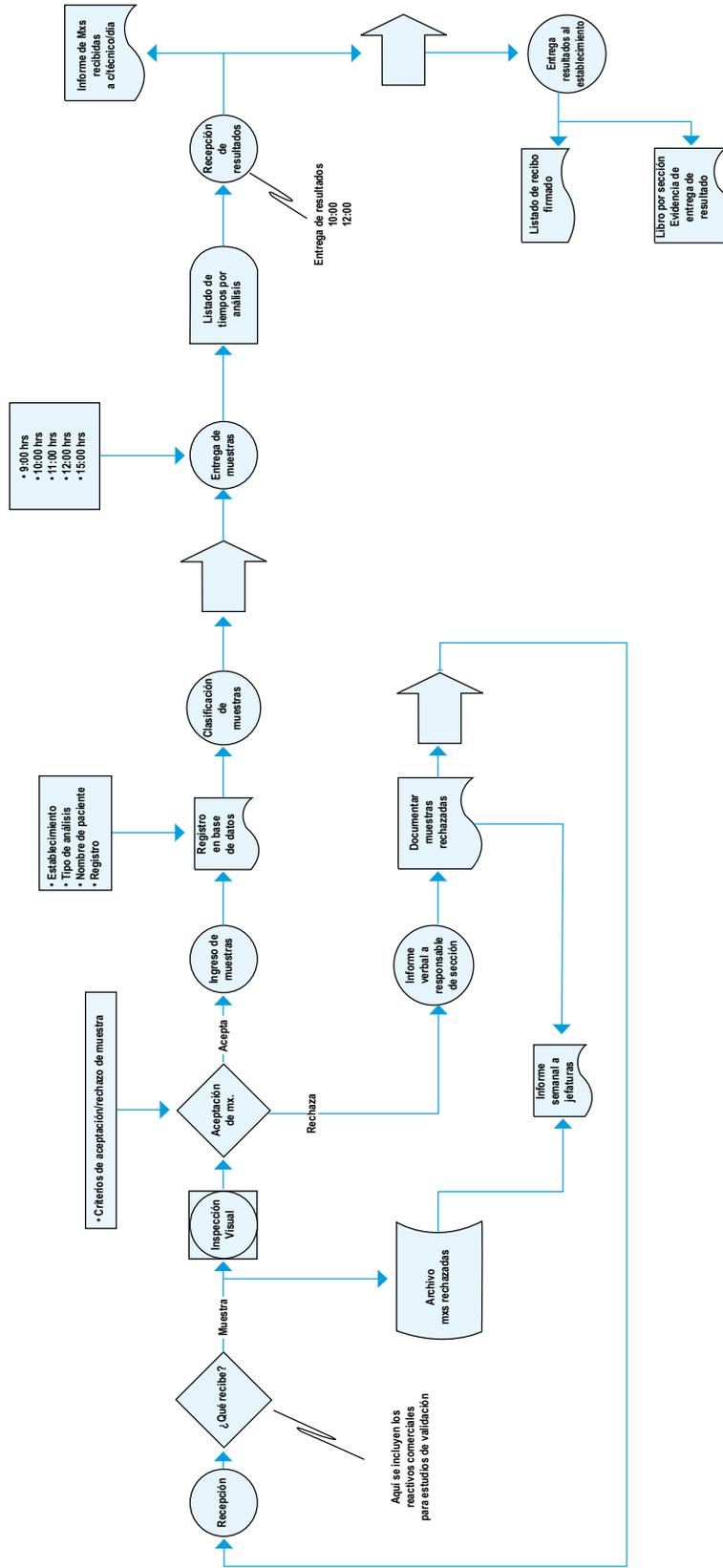
REQUISITO DE MUESTRA

| REQUISITOS DE LA MUESTRA | CARGA VIRAL VIH | LINFOCITO CD4/CD8 | ELISA/WESTERN BLOT VIH |
|------------------------------------|--|-----------------------------------|---|
| VOLUMEN Y TIPO DE MUESTRA | 4.0 ml (adulto) 3.0 ml (paciente pediátrico) Sangre Completa** | 2ml Sangre completa** | 1 ml Suero |
| ANTICOAGULANTE | EDTA Tubo tapón morado | EDTA Tubo / tapón morado | Sin anticoagulante Tubo tapón rojo |
| TEMPERATURA DE TRANSPORTE | 2-8°C (En cadena de frío) | No exceder de 37 °C (T° Ambiente) | 2-8°C En cadena de frío |
| DIA Y HORA DE RECIBO | Lunes a Jueves hasta 12.00m | Lunes a Jueves hasta 12.00 .am | Lunes a Viernes 7.30 am a 12.30m 1.10 pm a 3.30Pm |
| FORMULARIO DE SOLICITUD POR PRUEBA | completo | completo | completo |

**El volumen de la muestra debe colectarse a la marca de la presentación del tubo.

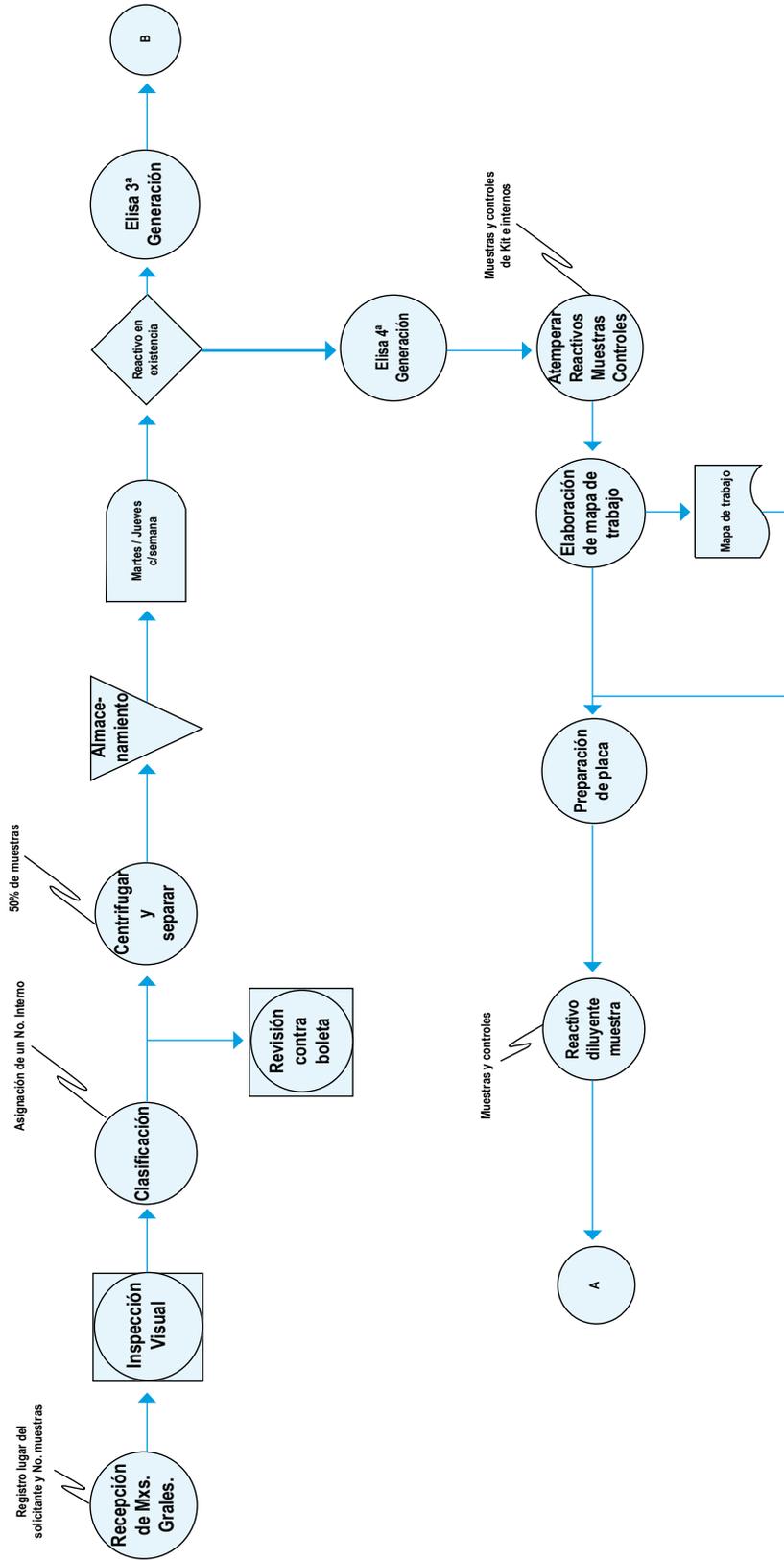
ANEXO 8

Criteria de aceptación o rechazo de muestras - año 2010



Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

Flujograma actividades preanálisis - año 2010



Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

ANEXO 10-A

Protocolo de trabajo pruebas ELISA/Prueba Rápida

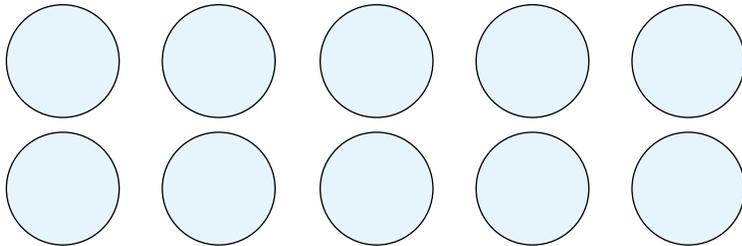
| | | | | | | | | | | | | |
|----------|---|---|---|---|---|---|---|---|---|----|----|----|
| | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
| A | | | | | | | | | | | | |
| B | | | | | | | | | | | | |
| C | | | | | | | | | | | | |
| D | | | | | | | | | | | | |
| E | | | | | | | | | | | | |
| F | | | | | | | | | | | | |
| G | | | | | | | | | | | | |
| H | | | | | | | | | | | | |

| | |
|-----------------------|-----------------------|
| RESPONSABLE: | FECHA DE VENCIMIENTO: |
| TÉCNICA: | LOTE: |
| FECHA DE REALIZACIÓN: | MARCA: |

Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

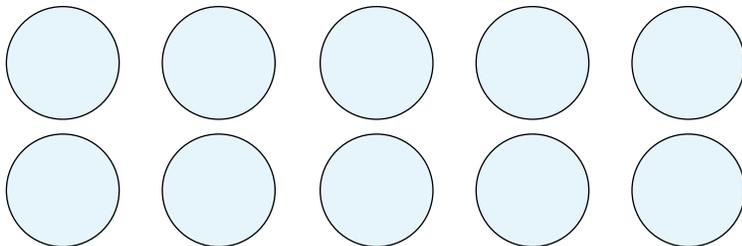
ANEXO 10-B

Protocolo de Trabajo Prueba rápida VIH



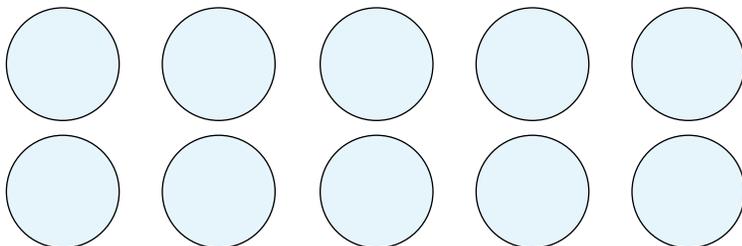
Responsable: _____
Fecha de Realización: _____
Fecha de Vencimiento: _____
Lote: _____ Marca: _____

Protocolo de Trabajo Prueba rápida VIH



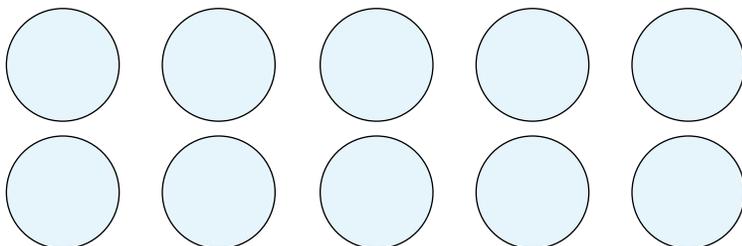
Responsable: _____
Fecha de Realización: _____
Fecha de Vencimiento: _____
Lote: _____ Marca: _____

Protocolo de Trabajo Prueba rápida VIH



Responsable: _____
Fecha de Realización: _____
Fecha de Vencimiento: _____
Lote: _____ Marca: _____

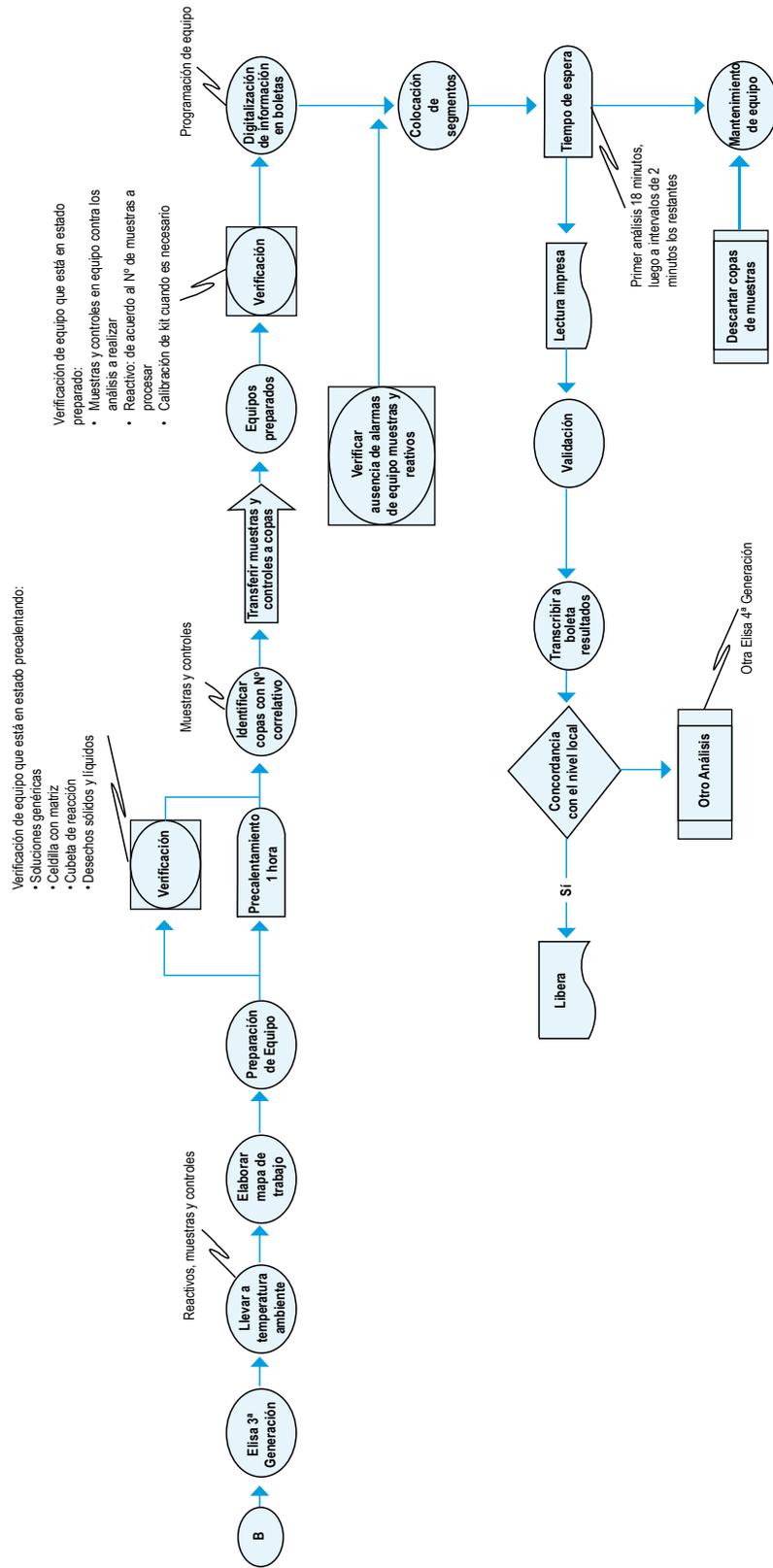
Protocolo de Trabajo Prueba rápida VIH



Responsable: _____
Fecha de Realización: _____
Fecha de Vencimiento: _____
Lote: _____ Marca: _____

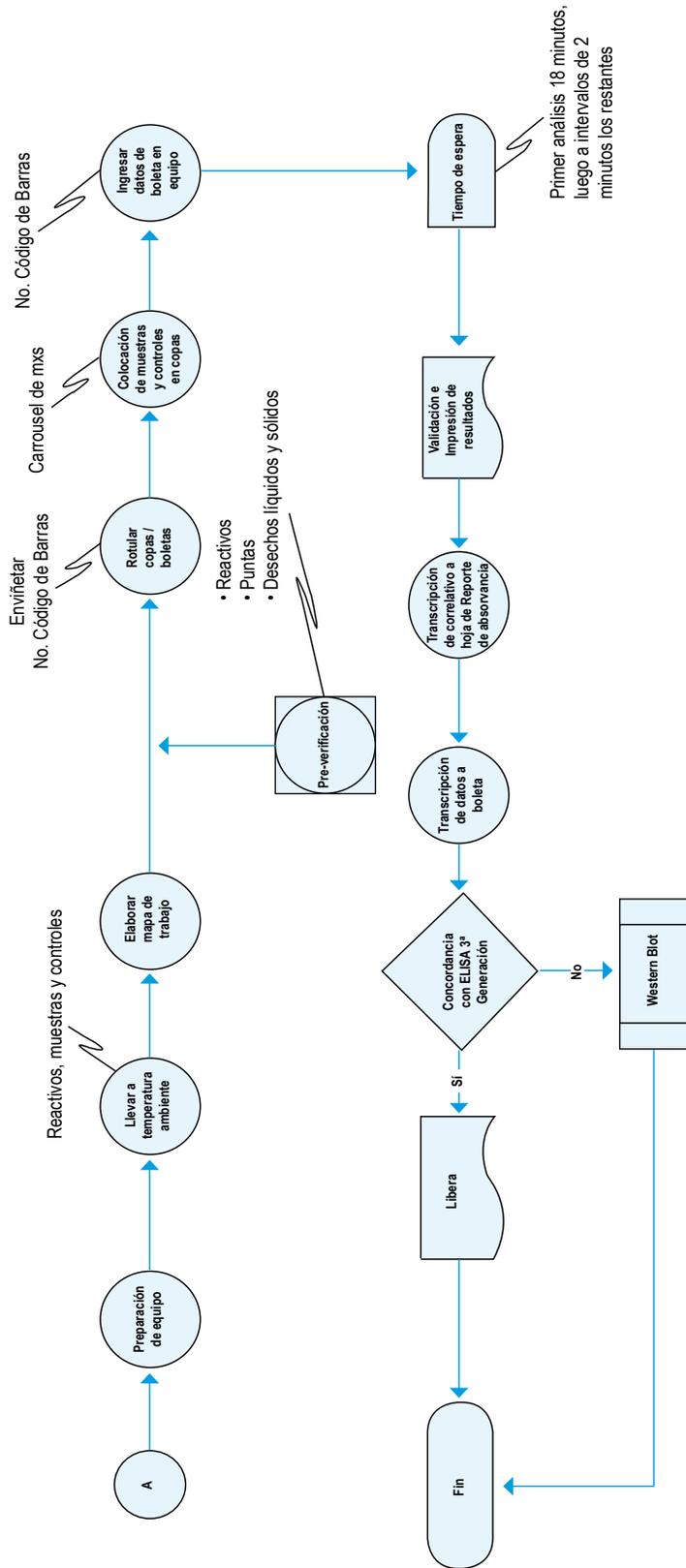
ANEXO 11

Flujograma ELISA 3ª generación - año 2010



Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

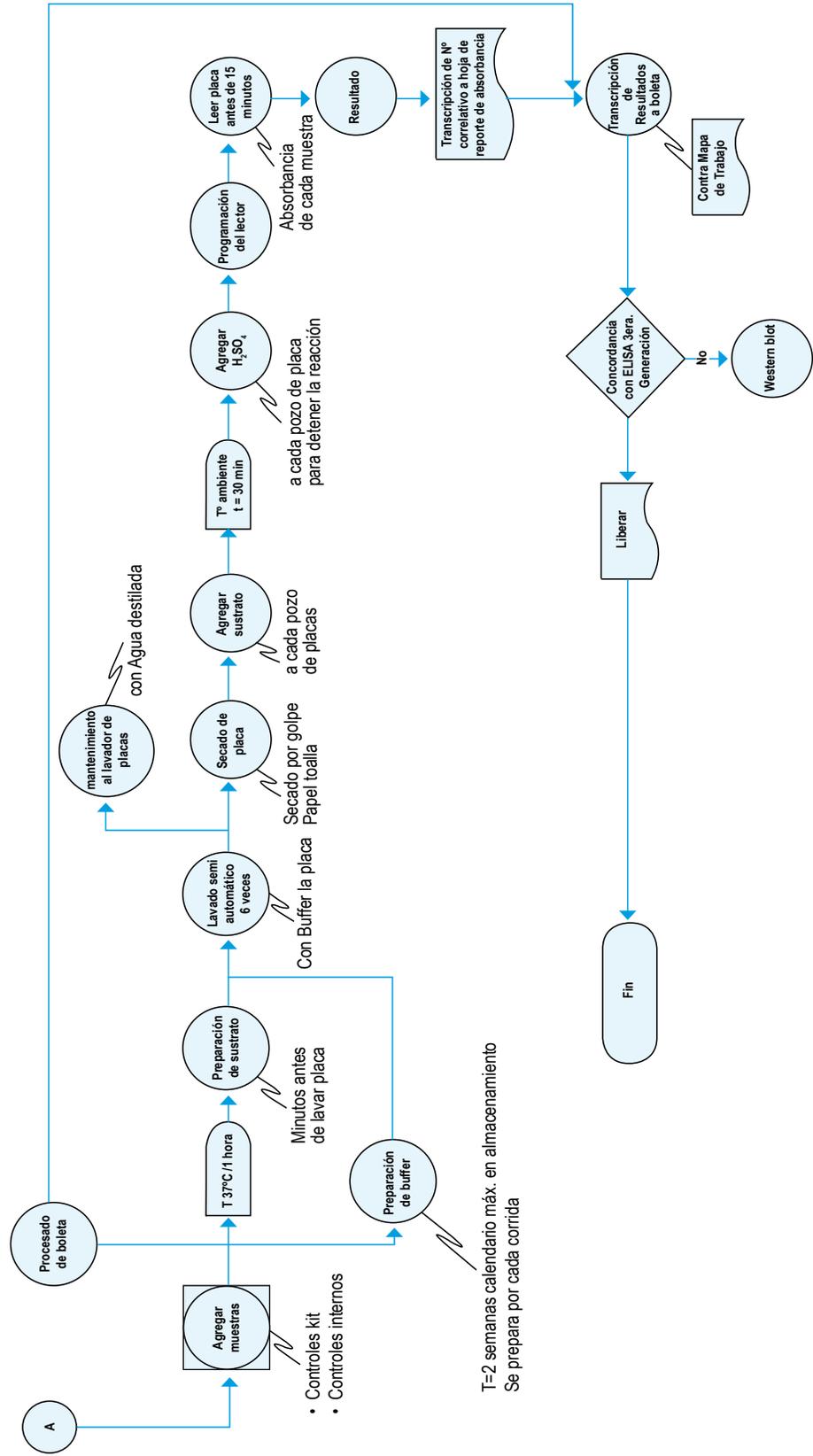
Flujograma ELISA 4ª Generación (Método automatizado) - año 2010



Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

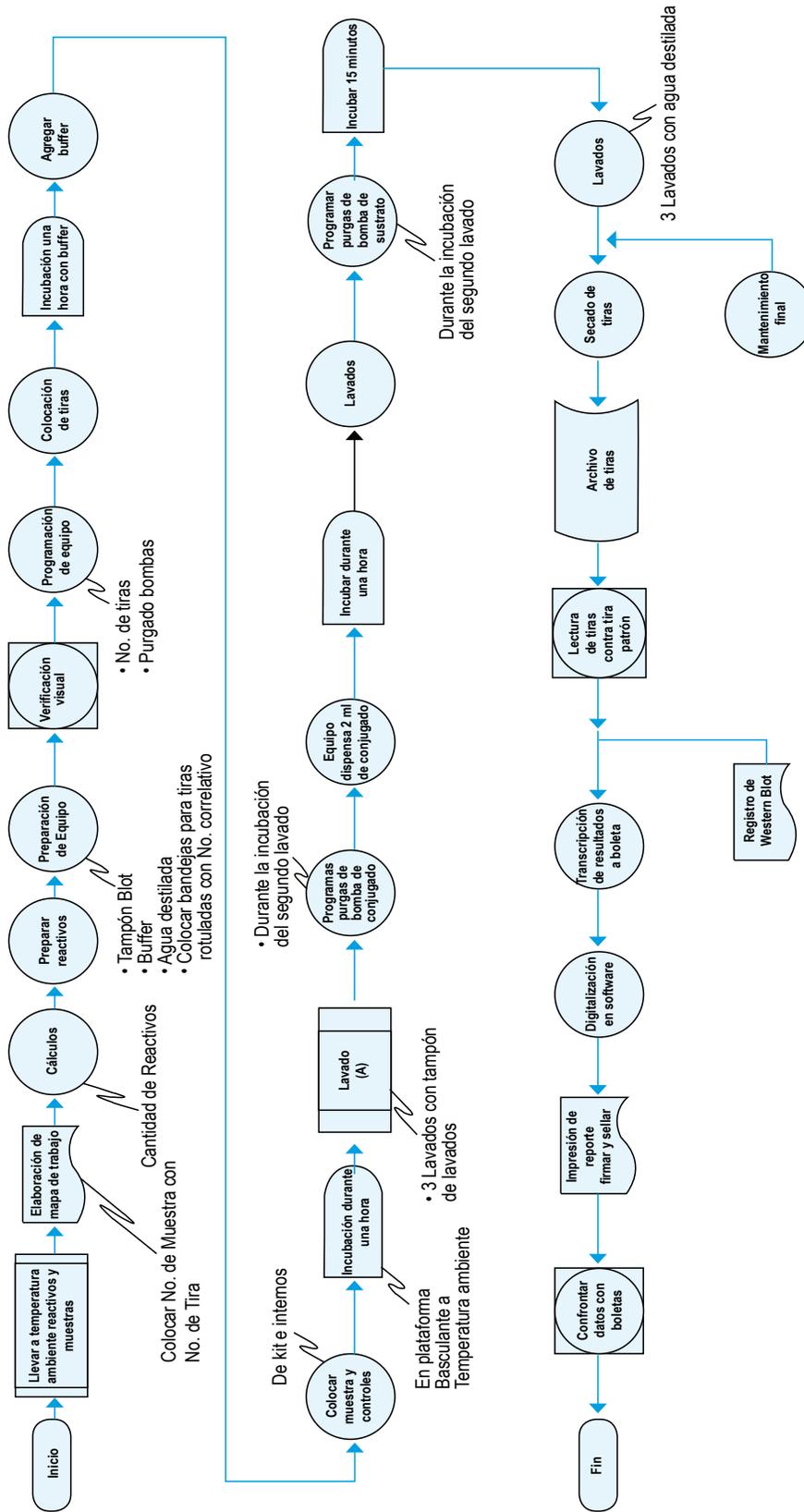
ANEXO 13

Flujograma ELISA 4^a. Generación (Método semiautomatizado) - año 2010



Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

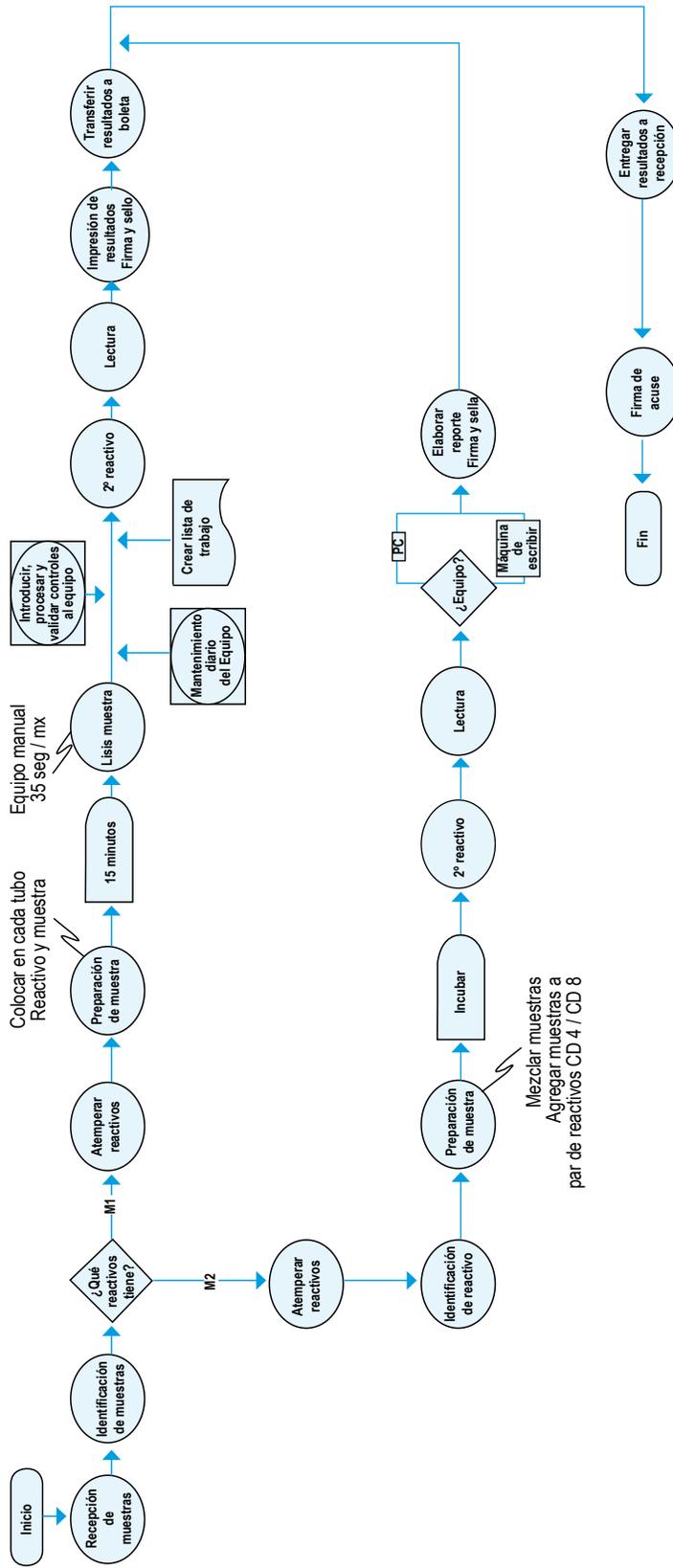
Flujograma WESTERN BLOT - año 2010



Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

ANEXO 14

Flujograma Linfocitos CD4-CD8 - año 2010



M1: Metodología 1
M2: Metodología 2

Fuente: Sección VIH/sida de la Unidad de Vigilancia Laboratorial.

ANEXO 16



Mecanismo de Coordinación de País El Salvador
Para los Programas del Fondo Mundial