

DIAGRAMA DE VERIFICACION PARA EVALUAR REACTIVOS DE HEMAGLUTINACION USADOS EN EL DIAGNOSTICO DE LA ENFERMEDAD DE CHAGAS¹

*Sumie Hoshino-Shimizu,² Teresa K. Nagasse-Sugahara,³
Euclides A. Castilho,⁴ Mario E. Camargo³
y Tamio Shimizu⁵*

INTRODUCCION

Los laboratorios que producen sus propios reactivos antigénicos para efectuar diagnósticos serológicos necesitan un método práctico y seguro de control de calidad para evaluar los lotes sucesivos de reactivos normalizados, con el fin de garantizar que podrán reproducirse los resultados de las pruebas.

Si bien se dispone de un gran número de modelos estadísticos para el análisis del control de calidad de agentes terapéuticos o de equipo y procedimientos del laboratorio clínico (1, 2), se han descrito muy pocos que sirvan para la evaluación de reactivos serológicos. Probablemente esto obedezca a que tales reactivos constituyen una categoría especial de productos biológicos que miden las intrincadas actividades de los anti-

cuerpos en el suero de pacientes infectados. El índice de producción mensurable, conocido como título, es el resultado de complejas interacciones entre múltiples epitopos del reactivo antigénico y una población de anticuerpos policlonales cuyas concentraciones varían según el paciente y la etapa de la enfermedad. En consecuencia, la evaluación de estos reactivos para garantizar que producen resultados uniformes y reproducibles exige un cuidado considerable.

Quando comenzamos a preparar reactivos de hemaglutinación para el diagnóstico de infecciones por *Trypanosoma cruzi* en nuestro laboratorio,⁶

³ Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Laboratorio de Inmunología.

⁴ Universidad de São Paulo, Facultad de Medicina, Departamento de Medicina Preventiva.

⁵ Universidad de São Paulo, Escuela Politécnica, Departamento de Ingeniería Industrial.

⁶ Laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil.

¹ Se publica en inglés en el *Bulletin of the Pan American Health Organization* Vol. 20, No. 2, 1986.

² Universidad de São Paulo, Facultad de Ciencias Farmacéuticas, Departamento de Análisis Clínico y Toxicológico, Sección de Inmunología Clínica. Dirección postal: Ave. Prof. Lineu Prestes 580, Conjunto das Químicas-Bloco 17, 05508 Cidade Universitária, São Paulo, Brasil.

a veces encontramos reactivos anómalos que daban resultados reproducibles con varios sueros normales pero que, en la labor ordinaria de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, eran menos sensibles o específicos que lo indicado por las evaluaciones preliminares. Se comprendió mejor el problema cuando se aplicó el análisis secuencial para verificar los índices de copositividad y conegatividad de estos reactivos mediante pruebas cualitativas (3). El número mucho mayor de muestras de suero incluidas entonces en el estudio de cada nuevo lote permitió observar que los sueros con títulos bajos eran los mejores indicadores para las evaluaciones.

En la mayoría de los laboratorios que producen reactivos serológicos en lotes pequeños, el control de calidad se efectúa por lo general en forma empírica, basándose precariamente en resultados obtenidos con algunos sueros normalizados o, incluso, con una sola mezcla de sueros. Esto obedece a que el análisis secuencial, si bien es seguro, requiere una cantidad relativamente grande de reactivo y un gasto considerable; por consiguiente, resulta inapropiado para el control de calidad de lotes de reactivo cuando este se produce en pequeñas cantidades.

Tratando de encontrar un procedimiento mejor que constituyera una opción práctica para la evaluación de reactivos de hemaglutinación, decidimos estudiar el "diagrama de verificación" o método gráfico originalmente creado por Shewart y mencionado por otros autores (4). Si bien el método se emplea en la industria y en laboratorios clínicos, aparentemente no se había aplicado antes para evaluar lotes de reactivos serológicos. Los resultados de la investigación, que fueron satisfactorios, se exponen aquí en detalle y permitirán utilizar el método estudiado.

MATERIAL

Y METODOS

La prueba de hemaglutinación

Se prepararon los reactivos y se efectuaron las pruebas de hemaglutinación en la forma descrita en otro informe (3); los reactivos se liofilizaron y se almacenaron a 4 °C.

Las muestras de suero

Se evaluaron los lotes de reactivo con conjuntos de muestras de suero provenientes del banco de suero de nuestro laboratorio. Las muestras incluían sueros de pacientes con enfermedad de Chagas, de pacientes con otras enfermedades y de sujetos aparentemente sanos. Como era difícil obtener suero que produjera títulos inferiores pero cercanos al título más bajo considerado positivo (40 u 80), se preparó un conjunto especial usando 23 muestras de suero obtenidas en la labor ordinaria de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, con títulos de ≥ 160 . Luego se estudió la eficacia de estos sueros para detectar reactivos defectuosos. Todos los sueros de prueba se conservaron en un volumen igual de glicerina de grado analítico (E. Merck, Darmstadt, Alemania) y se almacenaron a -20 °C. Los títulos obtenidos con los sueros se registraron como logaritmos de las diluciones de punto final, según se ha recomendado (5).

El método del diagrama de verificación

Es un método sencillo de control de calidad, en el cual se emplea un conjunto de muestras de suero preseleccionadas para evaluar lotes de reactivos de acuerdo con las diferencias entre los títulos obtenidos con un lote de prueba y los que produce un reactivo de referen-

cia. La desviación estándar promedio (\bar{s}) de esas diferencias se anota en una gráfica, donde un límite de verificación establecido previamente indica si la desviación en cuestión es aceptable o no. En nuestra investigación, el límite de verificación se estableció sobre la base de las desviaciones estándar encontradas con lotes de reactivos considerados aceptables después de un estudio estadístico basado en el análisis secuencial descrito en otra parte (3). No obstante, hubiera sido posible establecer inicialmente límites de verificación con lotes considerados satisfactorios sobre una base empírica.

En la práctica, el análisis de verificación de un nuevo lote de reactivos se efectuó mediante titulaciones séricas con conjuntos que incluían 10 muestras de suero reactivo y 10 de suero no reactivo. Para que el reactivo probado fuera considerado aceptable, los títulos obtenidos con los sueros reactivos debían presentar una desviación estándar que estuviera dentro del límite de verificación establecido, y todos los sueros no reactivos debían dar resultados negativos.

Otros métodos estadísticos usados

Se usó el análisis secuencial (3) para someter a prueba lotes de reactivos numerados del 12 al 18, del 25 al 36 y del 76 al 79. Con este método, previamente establecido en nuestro laboratorio, se determinó la aceptabilidad de un reactivo según la cantidad de resultados positivos falsos o negativos falsos obtenidos en ensayos cualitativos con conjuntos de más de 150 muestras de suero, de las cuales alrededor de la mitad eran positivas en relación con la enfermedad de Chagas y el resto eran negativas. Este método implica poner a prueba individualmente cada nuevo lote de reactivo.

También se usó otro método, basado en la determinación del coeficiente de correlación intraclase (CCI) (6) y

que proporciona un índice de coincidencia a partir del análisis de la varianza, para confirmar la uniformidad relativa de siete lotes de reactivo (los numerados del 12 al 18) seleccionados con el propósito de establecer un límite de verificación. Asimismo, se empleó para confirmar la uniformidad de los reactivos 50, 51 y 53, posteriormente seleccionados para una nueva evaluación del límite de verificación. Los valores del CCI obtenidos fueron el resultado de someter a prueba los reactivos en cuestión con un conjunto de 20 sueros positivos y 20 sueros negativos con respecto a infección por *T. cruzi*. En el caso de los lotes de reactivo numerados del 12 al 18, se efectuaron las pruebas dos veces en días diferentes y en el de los lotes 50, 51 y 53, tres veces, también en distintos días. Se consideraron aceptables los coeficientes $>0,7$.

RESULTADOS

Con el método del diagrama de verificación se probó un total de 26 lotes de reactivos de hemaglutinación para diagnosticar la enfermedad de Chagas. Se incluyeron lotes que habían sido rechazados o aceptados desde 1975, sobre la base del análisis secuencial (3).⁷

Para determinar el título de referencia (T_r) de cada muestra de suero del conjunto, diluciones progresivamente duplicadas de cada suero se probaron por

⁷ Los 26 lotes se numeraron de la siguiente manera: 12 a 18 (seleccionados para establecer el límite inicial del diagrama de verificación); 25 a 36; 50, 51 y 53 (seleccionados para revisión del límite del diagrama de verificación), y 76 a 79. Los lotes rechazados fueron los números 28, 30, 33 y 34. Todos los demás fueron aceptados.

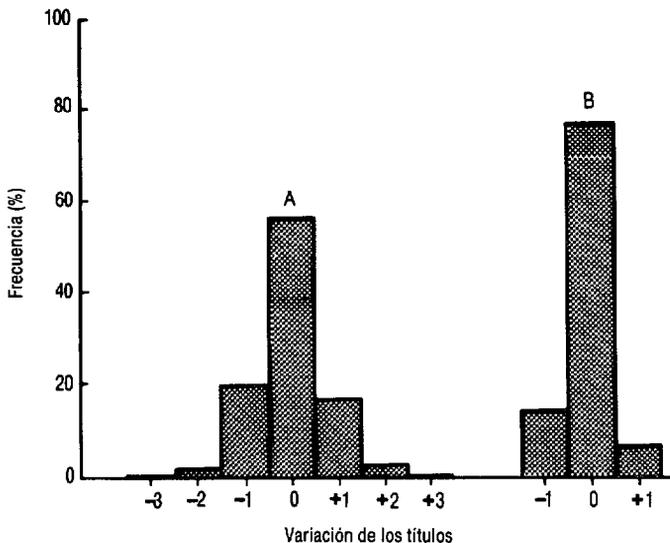
triplicado con un reactivo de hemaglutinación de referencia. No se observaron diferencias mayores de dos diluciones en ninguna de estas pruebas triples. En los casos en que no coincidieron los tres resultados con un determinado suero, se consideró como título de referencia el valor más frecuente (cuando eran iguales dos de los tres resultados) o el intermedio (cuando diferían los tres resultados).

Mediante el análisis secuencial se confirmó que eran aceptables los siete lotes de reactivos (numerados del 12 al 18) seleccionados con el fin de establecer el límite en el diagrama de verificación. (En conjunto, los siete lotes produjeron un coeficiente de correlación intracase de 0,88.) Cada lote de reactivo se probó

con el mismo conjunto de 40 muestras de suero, 20 de ellas provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas y 20 de sujetos sin infección por *T. cruzi*. Las pruebas se efectuaron por duplicado, la segunda en un día distinto del de la primera, y se compararon los resultados con los obtenidos con el reactivo de referencia. Como se puede ver en la figura 1, parte A, aproximadamente 95% de las variaciones de los títulos observadas representaban una diferencia no mayor de una dilución en relación con el título de referencia respectivo.

Al evaluar cada lote de reactivo, se registró la diferencia promedio entre los títulos observados y el título de referencia para cada suero, y se calculó la desviación estándar correspondiente al lote, considerando todo el conjunto de muestras. Luego se determinó la media

FIGURA 1. Diferencias entre los títulos obtenidos con un reactivo de referencia y los obtenidos con diversos lotes de reactivo cuando se probaron con 20 muestras de suero provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas. (A) Diferencias encontradas en dos pruebas (en días distintos) con los lotes de reactivos numerados del 12 al 18. (B) Diferencias encontradas en tres pruebas (en días distintos) con los lotes 50, 51 y 53 de reactivo mejorado. Todas las diferencias se expresan como \log_2 de la dilución de punto final dividida entre 10 ($\log_2 0,1 T - \log_2 0,1 Tr$)



aritmética (\bar{s}) de las desviaciones estándar de todos los lotes (4).

El límite de verificación usualmente recomendado equivale a tres veces esa media, o $3 \bar{s}$. En nuestro caso, las desviaciones estándar observadas en los siete lotes aprobados con el análisis secuencial fueron 0,467, 0,560, 0,438, 0,494, 0,694, 0,677 y 0,497 ($\bar{s} = 0,547$); por consiguiente, el triple de esta cifra ($3 \bar{s}$) fue de 1,64. Sin embargo, otros resultados obtenidos mediante el análisis secuencial de los lotes 27, 28, 30, 33 y 34 (el primero había sido aceptado, mientras que los otros cuatro fueron rechazados) proporcionó otra base para establecer el límite de verificación. Como sus desviaciones estándar, calculadas como se muestra en el cuadro 1, eran 1,34, 1,43, 1,54, 1,60 y 1,42, respectivamente, se apreció que debía establecerse un límite de verificación más bajo, entre $2 \bar{s}$ (1,09) y $3 \bar{s}$ (1,64). Por consiguiente, se tomó $2,5 \bar{s}$ como límite; esto correspondía a

una variación de 1,37, la cual aceptaba el lote 27 y rechazaba los demás.

Por lo general, se emplearon conjuntos de 10 muestras de suero reactivo y 10 de suero no reactivo para probar cada nuevo lote de reactivo, como se indica en el cuadro 1. Se comparó entonces el valor calculado para la desviación estándar con el límite de verificación (figura 2), con el fin de decidir si debía o no aceptarse el reactivo.

Cabe señalar que pocos años después de haberse adoptado estos procedimientos se introdujeron varias mejoras en la preparación y manipulación del reactivo. En consecuencia, se encontró que disminuían las variaciones de los títulos cuando lotes seleccionados (50, 51 y 53) se ponían a prueba tres veces (cada vez en un día diferente) con 20

CUADRO 1. Evaluación de un lote de reactivo (36) con el método del diagrama de verificación^a

Sueros positivos probados	Resultados con el reactivo de referencia		Resultados con el lote de reactivo No. 36			
	Tr ^b	log ₂ 0,1 Tr	T ^c	log ₂ 0,1 T	t' ^d	(t') ²
1	40	2	40	2	0	0
2	80	3	160	4	-1	1
3	80	3	80	3	0	0
4	160	4	160	4	0	0
5	320	5	320	5	0	0
6	160	4	160	4	0	0
7	320	5	320	5	0	0
8	160	4	160	4	0	0
9	1 280	7	2 560	8	+1	1
10	640	6	1 280	7	+1	1

^a Cálculo de \bar{s} para los sueros positivos:

$$\bar{s} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (t')^2/n-1}; \quad \bar{s} = \sqrt{3/9}; \quad \bar{s} = 0,577 \text{ (se acepta)}$$

Evaluación de los resultados con sueros negativos:

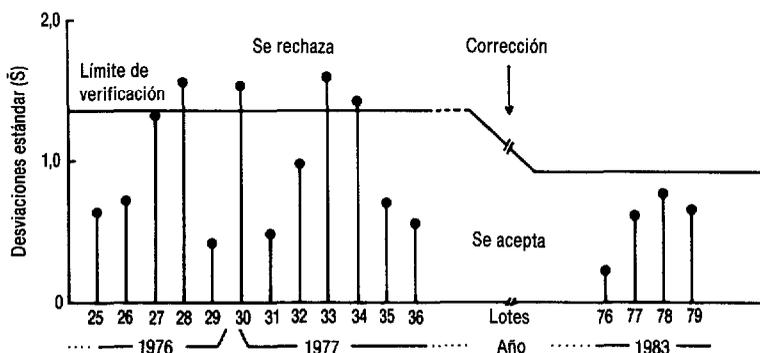
Sueros que dieron resultados negativos/No. de sueros negativos probados = 10/10 (se acepta)

^b Tr = título de referencia, dilución de punto final.

^c T = título del reactivo puesto a prueba, dilución de punto final.

^d t' = log₂ 0,1 T - log₂ 0,1 Tr.

FIGURA 2. Diagrama de verificación para lotes de reactivo de hemaglutinación usados en el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, producidos en distintos años. Se aceptaron o rechazaron los lotes según la desviación estándar promedio encontrada cuando los títulos que produjeron con un conjunto de 10 sueros negativos y 10 positivos se compararon con los obtenidos con un reactivo de referencia. El límite de verificación empleado inicialmente (1,37) fue luego reducido a 0,92 como resultado de la producción de un reactivo mejorado



sueros reactivos, como se indica en la figura 1, parte B. De acuerdo con esto, se calculó un nuevo límite de verificación. Las desviaciones estándar encontradas con los lotes 50, 51 y 53 fueron 0,536, 0,331 y 0,238, respectivamente ($\bar{s} = 0,368$). El nuevo límite de verificación corregido ($2,5 \bar{s}$) fue entonces de 0,92 (véase el límite corregido introducido en la figura 2).

Los tres lotes usados habían sido aceptados sobre la base del análisis anterior con el diagrama de verificación y habían presentado un elevado coeficiente de correlación intraclase (0,96). Ninguno de los 10 lotes de reactivo usados para establecer el límite inicial de verificación o para volver a evaluar ese límite dio resultados positivos falsos o negativos falsos cuando se probaron con conjuntos de 10 muestras de suero, 20 provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas y 20 de sujetos no infectados.

Un paso básico de los procedimientos anteriores fue la selección de muestras de suero apropiadas para ser in-

cluidas en los conjuntos que se pondrían a prueba. Antes de que comenzara esta selección se observó que, mediante el análisis secuencial previo, se había comprobado que los sueros con títulos bajos (40 u 80) eran indicadores especialmente eficaces para detectar la mala calidad de los reactivos. Sin embargo, esos sueros con títulos bajos son relativamente poco frecuentes y difíciles de conseguir. Por consiguiente, se emplearon sueros con títulos relativamente altos, como los sueros reactivos que por lo general encontramos en nuestra labor ordinaria de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas.

Más tarde, para confirmar la idoneidad del procedimiento, se probó un conjunto de 23 muestras de suero que producían títulos de ≥ 160 con cinco lotes de reactivo numerados del 30 al 34. Tres de ellos (30, 33 y 34) habían sido rechazados antes mediante evaluaciones con el diagrama de verificación y el análisis secuencial; los otros dos (31 y 32) habían sido aceptados. Como ya se señaló, los sueros de prueba deben presentar variaciones (en comparación con un patrón de referencia) de una dilución o menos

con un buen reactivo (véase figura 1, parte B), mientras que producen variaciones mayores cuando el reactivo es malo.

Para que resultaran útiles, los sueros de prueba debían ajustarse a ese modelo. Cuando se probaron con los reactivos buenos (31 y 32), los 23 sueros produjeron títulos con una diferencia no mayor de una dilución con respecto al título de referencia. A la inversa, cuando se pusieron a prueba con los reactivos deficientes (30, 33 y 34), 13 de los 23 produjeron títulos con una diferencia mayor de una dilución con respecto al título de referencia con los tres reactivos (cuadro 2); por tanto, se consideró que estos 13 sueros eran útiles para detectar lotes de reactivo de mala calidad. Además, otros seis sueros resultaron parcialmente útiles porque con uno o dos de los lotes de reactivo de mala calidad produjeron títulos con una diferencia mayor de una dilución con respecto al título de referencia. Los cuatro sueros restantes no fueron con-

siderados útiles porque no produjeron títulos con una diferencia de dos o más diluciones con respecto al título de referencia cuando se probaron con los tres reactivos malos. (Los sueros de este último tipo pueden introducir un sesgo en el trabajo de laboratorio y favorecer la aprobación de reactivos no satisfactorios.)

DISCUSION Y CONCLUSIONES

El presente estudio muestra la aplicación del método del diagrama de verificación para evaluar reactivos de hemaglutinación usados en el diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Si bien se basa en ensayos cuantitativos, las técnicas estadísticas usadas son sencillas y el método es fácil de aplicar. Desde luego, la elección de los métodos para someter a prueba reactivos depende de conjeturas acerca de la situación predominante, pero las ventajas prácticas de la técnica del diagrama de verificación justifican su empleo.

CUADRO 2. Resultados obtenidos con tres lotes de reactivo de mala calidad (30, 33 y 34) y dos de buena calidad (31 y 32)^a

Sueros probados (Tr ≥ 160)		Resultados con los reactivos de mala calidad (30, 33 y 34) ^b		Evaluación de los sueros probados
		Variaciones pequeñas en los títulos (t' = 0 ó ±1) ^c	Variaciones grandes en los títulos (t' = > ±1) ^c	
No.	%			
4	17,4	30, 33, 34	—	No útiles
2	8,7	30, 34	30	Parcialmente útiles
1	4,3	30, 34	33	Parcialmente útiles
1	4,3	34	30, 33	Parcialmente útiles
2	8,7	30	33, 34	Parcialmente útiles
13	56,6	—	30, 33, 34	Útiles

^a Los cinco lotes se probaron con 23 muestras de suero que producían títulos ≥ 160 con el reactivo de referencia. Trece de estos sueros produjeron títulos notablemente diferentes de los obtenidos con el reactivo de referencia cuando se los probó con cada uno de los tres reactivos de mala calidad.

^b También se sometieron a prueba dos lotes de reactivo de buena calidad (31 y 32) y solo se observaron variaciones mínimas en los títulos (t' = ±1) con los 23 sueros.

^c t' = log₂ 0,1 T - log₂ 0,1 Tr; donde T es el título obtenido con el lote de reactivo probado y Tr es el título del reactivo de referencia.

Nuestro estudio de sueros con títulos de anticuerpos de ≥ 160 claramente indica que no se puede garantizar un adecuado control de calidad de los reactivos poniéndolos a prueba con algunos sueros normalizados de este tipo, ya que es posible que esos sueros pertenezcan a la categoría de no útiles y no sean capaces de detectar un reactivo defectuoso. En este sentido, encontramos que nuestros pocos sueros normalizados (preparados mezclando muestras de suero) tenían características similares a los sueros considerados no útiles, probablemente porque esos sueros mezclados contenían concentraciones elevadas de anticuerpos para la mayoría de los epitopos de *T. cruzi* y diferían en este aspecto de la mayoría de los sueros individuales provenientes de pacientes con enfermedad de Chagas.

Como se señaló antes (3), el análisis secuencial ha demostrado que los sueros con títulos bajos (40 u 80) son indicadores particularmente eficaces para detectar lotes de reactivos defectuosos. Sin embargo, los estudios con el diagrama de verificación descritos en este artículo muestran que los sueros con títulos más elevados pueden servir como muestras de prueba muy adecuadas en los conjuntos de muestras de suero. Por fortuna, la preparación de tales conjuntos de muestras no es difícil, ya que se pueden obtener sueros de este tipo durante la labor normal de diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas. Los sueros no útiles constituyen alrededor de 17% del total de sueros reunidos de esta manera.

En la práctica, un buen conjunto de sueros debe tener muy pocos sueros no útiles o ninguno, y estar constituido por completo por sueros parcialmente útiles o útiles (y quizás por algunos sueros con títulos bajos), con el fin de asegurar su sensibilidad para detectar lotes de reactivos de mala calidad.

En general, las muestras de suero de un determinado conjunto pueden remplazarse por otras, siempre que los títulos y la capacidad de estas para detectar reactivos poco satisfactorios sean similares a los de las muestras remplazadas.

Un laboratorio que desee aplicar la técnica aquí descrita debe comenzar por preparar sus propios conjuntos de muestras de suero (probando los sueros con lotes de reactivo de hemaglutinación cuya buena o mala calidad se haya comprobado empíricamente) o bien obtener alguna ayuda de laboratorios establecidos. Una vez que se han determinado los títulos de referencia para estos sueros, se puede fijar el límite en el diagrama de verificación. Posteriormente, se pueden usar métodos estadísticos sencillos (la prueba t de Student u otros procedimientos apropiados) para confirmar la validez de los resultados obtenidos con el diagrama de verificación.

El trabajo que se da a conocer aquí se realizó con conjuntos de muestras de suero conservadas en volúmenes iguales de glicerina a -20°C , procedimiento que resultó muy adecuado; además de asegurar la estabilidad del suero, dicha temperatura permitió mantener en estado líquido las mezclas de glicerina y suero; de este modo, podían tomarse porciones con facilidad siempre que fuera necesario, sin correr el riesgo de que se produjera la desnaturalización de los anticuerpos que suele ser consecuencia del congelamiento y descongelamiento repetidos.

Recientemente hemos recibido una comunicación personal del Dr. Morris T. Suggs, Director del Programa de Productos Biológicos del Centro de Enfermedades Infecciosas de Atlanta, Estados Unidos de América, donde informa que aproximadamente 10 a 15%

de los reactivos para serodiagnóstico producidos cada año son de calidad deficiente, aun los suministrados por los fabricantes más importantes. En consecuencia, recomienda, como forma de obtener buenos reactivos a bajo costo, introducir el control de calidad desde el comienzo de la producción. El método del diagrama de verificación que se ha descrito constituye una forma práctica de evaluar lotes sucesivos de reactivo de hemaglutinación. Además, en parte porque ofrece un documento gráfico y progresivo de la variabilidad de los reactivos, proporciona un medio visual apropiado de control de calidad.

RESUMEN

Los laboratorios que producen sus propios reactivos antigénicos para el diagnóstico serológico necesitan métodos prácticos y fiables para someter a prueba lotes sucesivos de esos productos, con el fin de asegurar que se podrán reproducir los resultados de las pruebas. En el caso de los reactivos de hemaglutinación usados para el diagnóstico de la enfermedad de Chagas, la técnica del análisis secuencial permite un adecuado control de calidad; sin embargo, exige una cantidad relativamente grande de reactivo y entraña un gasto considerable. Se describe otro método, la técnica del diagrama de verificación, menos complicado y más apto para evaluar lotes pequeños de reactivo.

En este método se necesitan un reactivo de referencia, un conjunto de alrededor de 20 muestras de suero y un límite establecido de la varianza que, cuando es sobrepasado, determina el rechazo del lote puesto a prueba. La mitad de las muestras de suero deben ser reactivas con respecto al antígeno de *Trypanosoma cruzi* y la otra mitad deben ser no reactivas; los sueros reactivos tienen

que ser útiles en el sentido de que su respuesta ante un reactivo de buena calidad (como el de referencia) es distinta de la que manifiestan ante un mal reactivo.

Con este procedimiento, el reactivo de referencia y el reactivo que se quiere evaluar se ponen a prueba con el conjunto de muestras de suero; se observan las diferencias entre los títulos obtenidos con los dos reactivos y se calcula la desviación estándar promedio (\bar{s}). Cuando esta es inferior al límite de verificación previamente establecido, el lote de reactivo es aceptado; si supera el límite, se rechaza el lote. Este método ha sido usado por el Laboratorio de Inmunología del Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil, para evaluar 26 lotes de reactivos producidos en el laboratorio desde 1975; además, se ha comprobado que es aplicable y útil. Esa experiencia ha demostrado que los sueros que producen títulos relativamente altos pueden usarse para detectar reactivos de mala calidad, y que es eficaz la conservación de los sueros en un volumen igual de glicerina, almacenados a -20°C . □

AGRADECIMIENTO

Esta investigación contó en parte con el apoyo del Consejo Nacional para el Desarrollo Científico y Tecnológico del Brasil, subvención No. 222-8-156/80, y de la Organización Mundial de la Salud (OMS/TDR, subvención No. T16/81/T8/11(c)).

REFERENCIAS

- 1 Barnett, R. N. *Clinical Laboratory Statistics*, 2a. ed. Boston, Massachusetts, Little, Brown and Co., 1979.
- 2 Osol, A. *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 14a. ed. Easton, Pensilvania, Mack Publishing Company, 1970.
- 3 Hoshino-Shimizu, S., Camargo, M. E., Shimizu, T. y Nagasse-Sugahara, T. K. A study on the reproducibility of a stable, lyophilized reagent for the Chagas' disease hemagglutination test: Proposals for quality control analysis. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 24(2):63-68, 1982.
- 4 Burr, T. W. *Engineering Statistics and Quality Control*. New York, McGraw-Hill, 1953.
- 5 White, C. Statistical Methods in Serum Surveys. In: Paul, J. R. y White, C. eds. *Serological Epidemiology*. New York, Academic Press, 1973, p. 19.
- 6 Winer, B. J. *Statistical Principles in Experimental Design*. New York, McGraw-Hill, 1962.

SUMMARY

A CONTROL CHART METHOD FOR EVALUATING HEMAGGLUTINATION REAGENT USED IN CHAGAS' DISEASE DIAGNOSIS

Laboratories that produce their own antigen reagents for serodiagnostic purposes need to have practical and reliable ways of testing successive batches of those products so as to ensure the reproducibility of test results. In the case of hemagglutination reagents for the diagnosis of Chagas' disease, the technique of sequential analysis provides adequate quality control. However, sequential analysis requires a relatively large amount of reagent and considerable expense. This article describes another method, a "control chart" technique, that is less elaborate and seems better suited to assessing small reagent batches.

The latter method requires a reference reagent, a panel of some 20 serum samples, and an established limit of variance beyond which the reagent batch under assessment should be rejected. The serum samples should consist half of sera reactive with *Trypanosoma cruzi* antigen and half of nonreactive sera, and the reactive sera should be "useful" in the sense that they tend to respond differently when tested with a good reagent (such as the reference reagent) than with a poor reagent.

Following this procedure, both the reference reagent and the reagent to be assessed are tested against the serum panel; differences in the titers obtained by the two reagents are noted; the average standard deviation (\bar{s}) of these differences is calculated and charted; and if this deviation is less than the previously established control limit, the reagent batch is accepted; otherwise, it is rejected. This method has been used by the Immunology Laboratory at the Institute of Tropical Medicine in São Paulo, Brazil, to test 26 batches of reagent produced at the laboratory since 1975. That experience has shown

that sera yielding relatively high titers can be used to detect defective reagents, has indicated that preservation of sera in an equal volume of glycerin and storage at -20°C is effective, and has demonstrated the applicability and usefulness of the control chart method.

RESUMO

DIAGRAMA DE VERIFICAÇÃO PARA AVALIAR REAGENTES DE HEMAGLUTINAÇÃO USADOS NO DIAGNÓSTICO DA DOENÇA DE CHAGAS

Os laboratórios que produzem seus próprios reagentes antigênicos para o diagnóstico serológico necessitam de métodos práticos e confiáveis para testar lotes sucessivos desses produtos, a fim de assegurar que os resultados dos exames poderão ser reproduzidos. No caso dos reagentes de hemaglutinação usados para o diagnóstico da doença de Chagas, a técnica da análise seqüencial permite um adequado controle de qualidade; todavia, exige uma quantidade relativamente grande de reagente e implica um gasto considerável. Descreve-se outro método, a técnica do diagrama de verificação, menos complicado e mais apto para avaliar lotes pequenos de reagente.

Esse método exige um reagente de referência, um conjunto de cerca de 20 amostras de soro e um limite estabelecido de variância que, quando é ultrapassado, determina a rejeição do lote testado. A metade das amostras de soro deve ser reativa com respeito ao antígeno de *Trypanosoma cruzi* e a outra metade não reativa; os soros reativos são úteis no sentido de que sua resposta ante um

reagente de boa qualidade (como o de referência) é distinta da que manifestam ante um reagente de má qualidade.

Com esse procedimento, o reagente de referência e o reagente que se quer avaliar são testados com o conjunto de amostras de soro; observam-se as diferenças entre os títulos obtidos com os dois reagentes e se calcula o desvio padrão médio (\bar{s}). Quando é inferior ao limite de verificação previamente estabelecido, o lote de reagente é aceito; se ultrapassa o limite, o lote é rejeitado. Esse método foi usado no Laboratório de Imunologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, Brasil, para avaliar 26 lotes de reagentes produzidos no laboratório desde 1975; além do mais, comprovou-se que é aplicável e útil. Essa experiência demonstra que os soros que produzem títulos relativamente altos podem ser usados para detectar reagentes de má qualidade e que é eficaz a conservação dos soros num volume igual de glicerina, armazenados a -20°C .

RÉSUMÉ

DIAGRAMME DE VÉRIFICATION POUR ÉVALUER LES AGENTS RÉACTIFS DE L'HÉMAGLUTINATION UTILISÉS DANS LE DIAGNOSTIC DE LA MALADIE DE CHAGAS

Les laboratoires qui produisent leurs propres réactifs antigéniques pour le diagnostic sérologique nécessitent des méthodes pratiques et fiables pour tester des lots successifs de ces produits afin d'assurer la reproduction des résultats obtenus avec les échantillons. Dans le cas des agents réactifs de l'hémaglutination utilisés pour le diagnostic de la maladie de Chagas, la technique de l'analyse séquentielle permet un contrôle de qualité satisfaisant; cependant, il faut une

quantité relativement grande de réactif, ce qui entraîne une dépense considérable. Une autre méthode est décrite, la technique du diagramme de vérification, moins compliquée et plus apte à évaluer des lots restreints de réactif.

Cette méthode nécessite un réactif de référence, un ensemble d'une vingtaine d'échantillons de sérum et une limite fixée à la variance qui, quand elle est dépassée, entraîne le rejet du lot testé. La moitié des échantillons de sérum doivent être réactifs à l'antigène de *Trypanosoma cruzi* et l'autre moitié doit être non réactive; les sérums réactifs doivent être utiles en ce sens que leur réponse à un réactif de bonne qualité (tel que celui de référence) est distincte de celle qui se produit face à un mauvais réactif.

Avec ce procédé, le réactif de référence et le réactif que l'on veut évaluer sont

testés vis-à-vis l'ensemble des échantillons de sérum; on observe les différences entre les titres obtenus avec les deux réactifs et l'on calcule l'écart type moyen (\bar{s}). Lorsqu'il est inférieur à la limite de vérification établie précédemment, le lot de réactif est accepté; si cette limite est dépassée, le lot est rejeté. Cette méthode a été utilisée par le laboratoire d'immunologie de l'Institut de médecine tropicale de São Paulo, Brésil, pour évaluer 26 lots de réactif produits au laboratoire depuis 1975; en outre, on a constaté qu'elle est applicable et utile. Cette expérience a montré que les sérums qui produisent des titres relativement élevés peuvent être utilisés pour détecter les réactifs de mauvaise qualité et qu'il est efficace de conserver les sérums dans un volume égal de glycérine, stockés à -20°C .

Atención primaria y poliomieltis

"El control de cualquier enfermedad importante de la infancia en los países en desarrollo depende de la capacidad de los servicios de salud de llegar a la población susceptible y de administrar la terapia adecuada o adoptar medidas preventivas. A ambas necesidades se orienta el desarrollo de los servicios de atención primaria de salud. La probabilidad es que las enfermedades prevenibles mediante vacunación, incluida la poliomieltis, solo podrán controlarse mediante programas que se apliquen a través del sistema de atención primaria de salud."

Tomado de: Robinson, D. Recursos políticos, administrativos y económicos para el control de la poliomieltis. In: *Simposio Internacional sobre el Control de la Poliomieltis*. ops, Publicación Científica 484, 1985, p. 423.