GARANTIA DE CALIDAD EN EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

REPRESENTACION OPS/OMS
ARGENTINA

42 1995

MANUAL DE LABORATORIO

Organización Panamericana de la Salud

Oficina Sanitaria Panamericana Regional

de la **Organización Mundial de la Salud**

GARANTIA DE CALIDAD EN EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

MANUAL DE LABORATORIO

GARANTIA DE CALIDAD EN EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA INFECCION POR EL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Publicación Nº 42

El presente manual fué realizado con el apoyo del Programa de SIDA y Enfermedades de Transmisión Sexual de la Organización Panamericana de la Salud, Oficina Regional de la Organización Mundial de la Salud y sus representaciones de Argentina, Chile y Uruguay

Organización Panamericana de la Salud
Oficina Sanitaria Panamericana Regional
de la **Organización Mundial de la Salud**

© Organización Panamericana de la Salud

I.S.B.N. 950-710-050-4

Las opiniones expresadas en este trabajo son de exclusiva responsabilidad de los autores.
Se autoriza la reproducción y traducción siempre y cuando se cite la fuente.

AUTORES

Manuel Gómez Carrillo
Centro Nacional de Referencia para el SIDA
Facultad de Medicina,UBA, Buenos Aires, Argentina

Judith Mora
Centro Nacional de Referencia del SIDA
Instituto de Salud Pública, Santiago, Chile

José Carlos Russi
Laboratorio Nacional de Referencia SIDA VIH.
Ministerio de Salud Pública, Montevideo,Uruguay

COLABORADORES

Osvaldo V. Libonatti
Silvia Balinotti y Sandra Pampuro
Centro Nacional de Referencia para el SIDA
Facultad de Medicina,UBA Buenos Aires, Argentina

Eugenio Ramírez
Centro Nacional de Referencia del SIDA
Instituto de Salud Pública, Santiago,Chile

COORDINADORA

Mercedes Weissenbacher
Asesora Interpaís para el Cono Sur en SIDA
OPS/OMS, Montevideo, Uruguay

INDICE

Introducción 9

1. Virus de la inmunodeficiencia humana. 11

2. Infección por VIH. 14

3. Diagnóstico serológico de la infección por VIH. 16
3.1. Tamizaje 16
3.1.1. Enzimoinmunoensayo (EIE, EIA, ELISA) 16
3.1.2. Pruebas de aglutinación 18
3.1.3. Inmuno dot (dot blot) 20
3.1.4. Selección de una prueba para tamizaje 20
3.2. Pruebas suplementarias o de confirmación 21
3.2.1. Western blot (WB) 22
3.2.2. Inmunofluorescencia indirecta (IFI) 25
3.2.3. Inmunoensayo de línea (LIA) 26
3.2.4. Prueba de radioinmunoprecipitación(RIPA) 26
3.3. Pruebas suplementarias adicionales 26
3.4. Algoritmo diagnóstico 27

4. Programa de garantia de calidad. 30
4.1. Garantía de calidad 30
4.2. Control de calidad 31
4.3. Valoración externa de la calidad 32

5. Buenas prácticas de laboratorio. 34
5.1. Organización y selección del personal 34
5.2. Guías de procedimientos 35
5.3. Mantenimiento y control del instrumental y accesorios. 35
5.4. Mediciones con pipetas 36
5.4.1. Uso de pipetas de vidrio 36
5.4.2. Uso de pipetas mecánicas 36
5.5. Registro de datos 37

5.5.1. Registros de ingreso y codificación de la muestra 37
5.5.2. Protocolo de trabajo 38
5.5.3. Registro e informe de los resultados 38
5.6. Errores técnicos comunes 38

6. Recomendaciones de bioseguridad para laboratorios de diagnóstico 40
6.1. Recomendaciones generales 41
6.2. Proceso de descontaminación 44
6.2.1. Descontaminantes físicos 44
6.2.2. Descontaminantes químicos 44
6.2.3. Manejo y eliminación de material contaminado y de desechos 45
6.3. Conducta ante accidentes 46
6.4. Manejo y transporte de materiales biológicos 47

Glosario 50

Bibliografía 52

INTRODUCCION

A medida que la epidemia por VIH se expande por el mundo se hace más evidente la necesidad de encarar globalmente su control. El laboratorio, en las estrategias de control de la infección por VIH, constituye hoy día una pieza fundamental ya que posibilita su diagnóstico y permite reducir a un mínimo la transmisión transfusional.

Un resultado erróneo -positivo o negativo- puede tener serias consecuencias para el individuo involucrado, así como para la sociedad, por lo que se hace necesario la optimización de los procedimientos diagnósticos (GARANTIA DE CALIDAD), independientemente de los niveles de desarrollo de los laboratorios y bancos de sangre.

Este manual constituye una guía para todos los laboratorios que realizan pruebas serológicas de tamizaje para el diagnóstico de la infección por VIH, estableciendo pautas para las diferentes etapas involucradas, desde la obtención de la muestra hasta el informe final.

El presente material pretende presentar en forma breve y concisa los aspectos más importantes vinculados con la realización de la serología para VIH y que están involucrados en la calidad final de los estudios serológicos. La bibliografía aportada permitirá, a quien lo desee, profundizar en los diversos puntos desarrollados en este manual.

Esta publicación está dirigida a los administradores de salud y a todo el personal de los laboratorios vinculados directamente con el funcionamiento de éstos.

1. VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

El VIH pertenece a la familia RETROVIRIDAE, subfamilia LENTIVIRINAE. Hasta el momento se acepta la existencia de dos tipos de Virus de la Inmunodeficiencia Humana: el VIH-1, ampliamente diseminado en todo el mundo y el VIH-2, con elevada prevalencia en Africa Occidental pero raro en otras zonas geográficas.

El VIH es una partícula esférica, (fig. 1) constituída por una envoltura proveniente de la membrana externa de la célula huésped, en la que están incluídas numerosas espículas formadas por dos

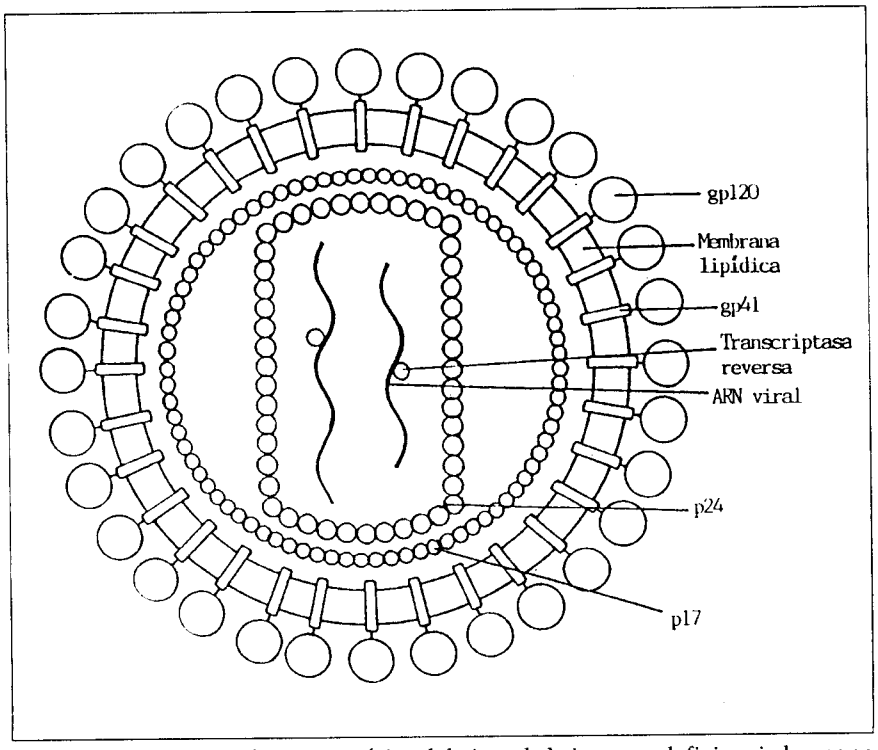


Figura 1: Representación esquemática del virus de la inmunodeficiencia humana

glicoproteínas: la gp120 (más externa) y la gp41 de transmembrana. Debajo de la envoltura se encuentra la cápside, de simetría icosaédrica, constituida por la proteína p17.

Dentro de la cápside se encuentra el core, de forma conoide y estructura proteica (proteína p24) y que contiene al nucleoide, constituido por dos cadenas de ARN monocatenario íntimamente relacionadas con las proteínas p9 y p7 y las enzimas integrasa, proteasa y transcriptasa reversa.

El genoma del VIH está constituido por dos secuencias terminales repetitivas (LTR), los genes env, gag y pol (genes estructurales comunes a todos los retrovirus) y una serie de genes reguladores que intervienen en la replicación viral (tabla 1).

El ciclo replicativo del VIH comienza con la unión específica de la gp120 con el receptor celular CD4. Luego tiene lugar la fusión de la envoltura viral con la membrana celular, seguida por la penetración del core al citoplasma. Posteriormente se inicia la transcripción, merced a la transcriptasa reversa viral, que da origen a una doble cadena de ADN.

El ADN bicatenario resultante se circulariza y migra al núcleo celular donde puede integrarse al ADN de la célula huésped y constituirse en un provirus o permanecer en forma episomal no integrada.

Las células infectadas pueden portar el provirus por largos períodos en forma silente. Sin embargo, ante diversas circunstancias se puede iniciar la transcripción del ADN proviral con la consiguiente síntesis de ARN y proteinas virales. El ciclo replicativo concluye cuando los virus progenie se ensamblan y brotan de la célula huésped.

Tabla 1

PROTEINAS DEL VIRUS DE LA INMUNODEFICIENCIA HUMANA

Gen	Productos del gen	Descripción
env (envolotura)	gp 160	Precursor de glicoproteínas de envoltura.
	gp 120	Glicoproteina de envoltura (externa)
	gp 41	Glicoproteína de transmembrana
gag (core)	p 55	Precursor de proteínas gag
	p 24	Proteína gag
	p 17	Proteína gag (submembrana)
	p 15, p 9, p7	Proteínas gag
pol (polimerasa)	p 66	Transcriptasa reversa
	p 51	Proteasa
	p 31	Endonucleasa (integrasa)
tat (transactivador)	p 14	Transactivador vural
rev (regulador)	p 19/20	Regula expresión de proteínas
vif (factor de infectividad)	p 23	Determina infectividad del virión
nef (regulador negativo)	p 27	Reduce expresión viral
vpu (en HIV-1)	p 18	Actúa en la liberación de partículas virales
vpx (en HIV-2)	p 14	Desconocida

2. INFECCION POR VIH

A pesar de que el virus se encuentra en todos los fluídos corporales de los pacientes infectados, sólo se transmite por contacto sexual, por inoculación de sangre o hemoderivados y por vía vertical (de la madre al hijo) ya sea durante la gestación, el parto o la lactancia.

La infección por VIH va seguida de un período asintomático de duración variable que oscila entre 2 a 15 años.

Generalmente la respuesta humoral aparece entre las 2 y 8 semanas post-infección y puede estar acompañada de alguna sintomatología transitoria (fig.2).

El período que transcurre entre la infección y la aparición de los primeros anticuerpos circulantes se conoce como «**período de ventana**» y se caracteriza por una activa replicación viral. La apari-

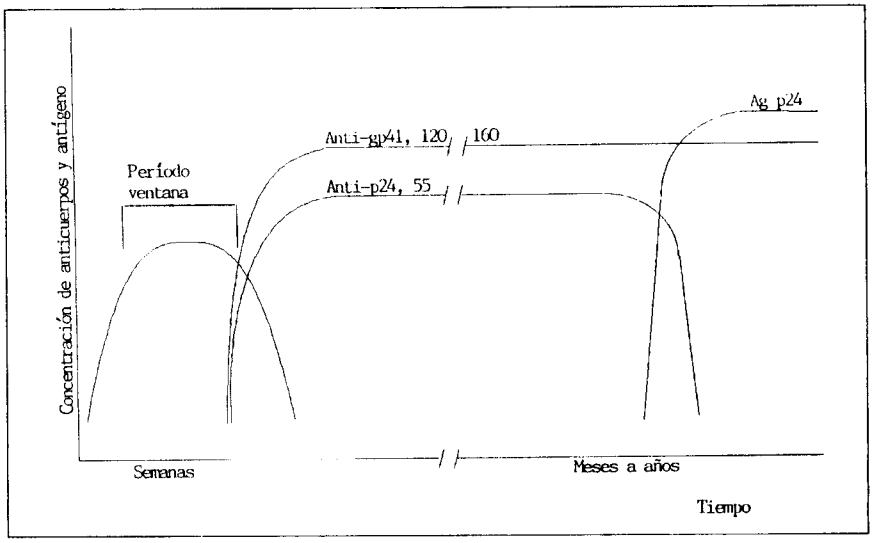


Figura 2: Antigenemia y respuesta de anticuerpos durante la infección por VIH

ción de anticuerpos específicos se correlaciona con una disminución de la replicación viral y se establece el período asintomático en el cual el nivel de anticuerpos se mantiene.

El deterioro progresivo de la función inmunológica lleva a la aparición de la sintomatología que caracteriza a las etapas avanzadas de la infección (SIDA) en la cual puede haber disminución de los niveles de anticuerpos específicos circulantes.

La evolución de la infección asintomática al SIDA está determinada por la progresiva alteración de las células que participan en la respuesta inmune, caracterizada principalmente por una marcada depleción de linfocitos T CD4+.

El progreso de la enfermedad está relacionado con la inversión de la relación CD4/CD8, la aparición de infecciones oportunistas y la caída de los anticuerpos dirigidos contra el virus, disminuyendo en primer término los anticuerpos contra los productos del gen gag y luego los dirigidos contra los productos de los genes env y pol.

3. DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA INFECCION POR VIH

El diagnóstico de infección por VIH se realiza habitualmente a través de la determinación de anticuerpos específicos antivirales, en dos niveles de pruebas serológicas: **Pruebas de tamizaje y pruebas suplementarias.**

3.1 Tamizaje

En este nivel diagnóstico se utilizan técnicas de gran sensibilidad que permiten la pesquisa de individuos infectados. Esta alta sensibilidad puede generar, en algunos casos, resultados positivos falsos. Estas metodologías no deben utilizarse como procedimientos de diagnóstico definitivo ya que en algunos individuos se obtienen resultados reactivos en ausencia de infección. Por consiguiente se requiere la utilización de **pruebas suplementarias (pruebas de confirmación)** para la verificación de la reactividad primaria.

Frente a una reactividad primaria **siempre** se deberá reensayar la muestra en duplicado antes de pasar a la etapa de confirmación. De esta forma se descartan **reactividades no repetibles** que se observan con todos los procedimientos de tamizaje.

3.1.1 Enzimoinmunoensayo (EIE, EIA, ELISA)

Fueron las primeras pruebas desarrolladas. Se trata de una metodología ampliamente difundida y de la cual existe una gran variedad de equipos comerciales de diagnóstico disponibles. La mayoría **-técnica indirecta-** poseen antígenos del VIH en una fase o soporte sólido. Estos antígenos pueden tener diferentes orígenes (lisados virales, antígenos recombinantes o péptidos sintéticos). Los soportes sólidos pueden ser pocillos de microplacas, esferas plásticas o papel de nitrocelulosa. (fig.3)

El primer paso en el enzimoinmunoensayo es la incubación del suero o plasma con los antígenos unidos al soporte sólido. De existir anticuerpos anti VIH en la muestra se unirán a los antígenos virales.

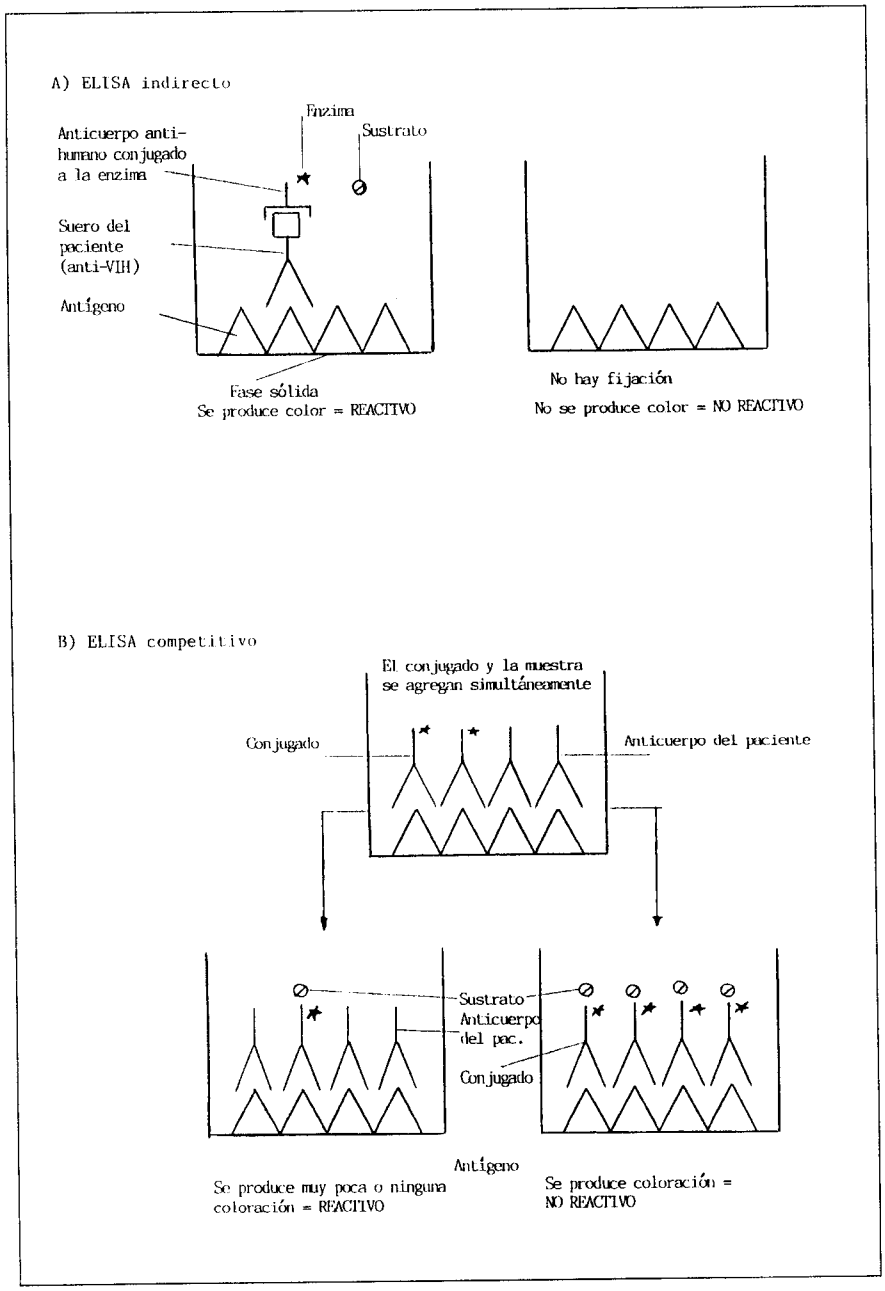


Figura 3: Principio del ELISA.

Por medio de lavados se remueven todos aquellos anticuerpos no unidos al soporte. Luego se agrega una solución de anticuerpos dirigidos contra inmunoglobulinas humanas. Esta solución lleva el nombre de **conjugado** ya que éstos anticuerpos se encuentran unidos o conjugados con una enzima que mediará en el sistema de detección.

Generalmente las enzimas utilizadas son peroxidasa o fosfatasa alcalina. Su función en el sistema es modificar un sustrato químico en presencia de un cromógeno (componente productor de color) de forma tal que una muestra reactiva será evidenciable por el desarrollo de color al adicionarse el sustrato.

Esto puede ser interpretado tanto visualmente como por medio de un espectrofotómetro. La utilización de un espectrofotómetro brinda mayor seguridad en la interpretación de los resultados - lectura objetiva, independiente del observador- y permite diferenciar reacciones débiles.

Existen también algunas variantes de esta metodología como el **ELISA competitivo** en el cual la muestra a ensayar se incuba con un suero anti VIH conjugado con una enzima. El conjugado compite por el antígeno viral de la fase sólida con los anticuerpos de la muestra. La presencia de anticuerpos se evidenciará por la falta de desarrollo de color.

Si por el contrario la muestra no contiene anticuerpos anti VIH, el conjugado podrá unirse al antígeno en la fase sólida lo que se traduce en la presencia de color al final de la prueba.

Recientemente se han desarrollado pruebas inmunoenzimáticas similares a las técnicas indirectas pero en las cuales el revelado de la reacción se realiza utilizando antígenos marcados con enzimas, en lugar de las antiglobulinas (**técnicas de tercera generación o de sandwich de antígeno**). De esta manera se forma un sandwich antígeno-anticuerpo-antígeno marcado que permite detectar todas las clases de inmunoglobulinas (IgG, IgA, IgM).

3.1.2 Pruebas de aglutinación

Estas pruebas utilizan el método de aglutinación como sistema indicador. Los antígenos virales son unidos a micropartículas que pueden ser de distinto material (partículas de látex, partículas de gelatina, glóbulos rojos o micropartículas sintéticas). La reactividad de una muestra se visualiza por una reacción de aglutinación de las partículas sensibilizadas (fig 4).

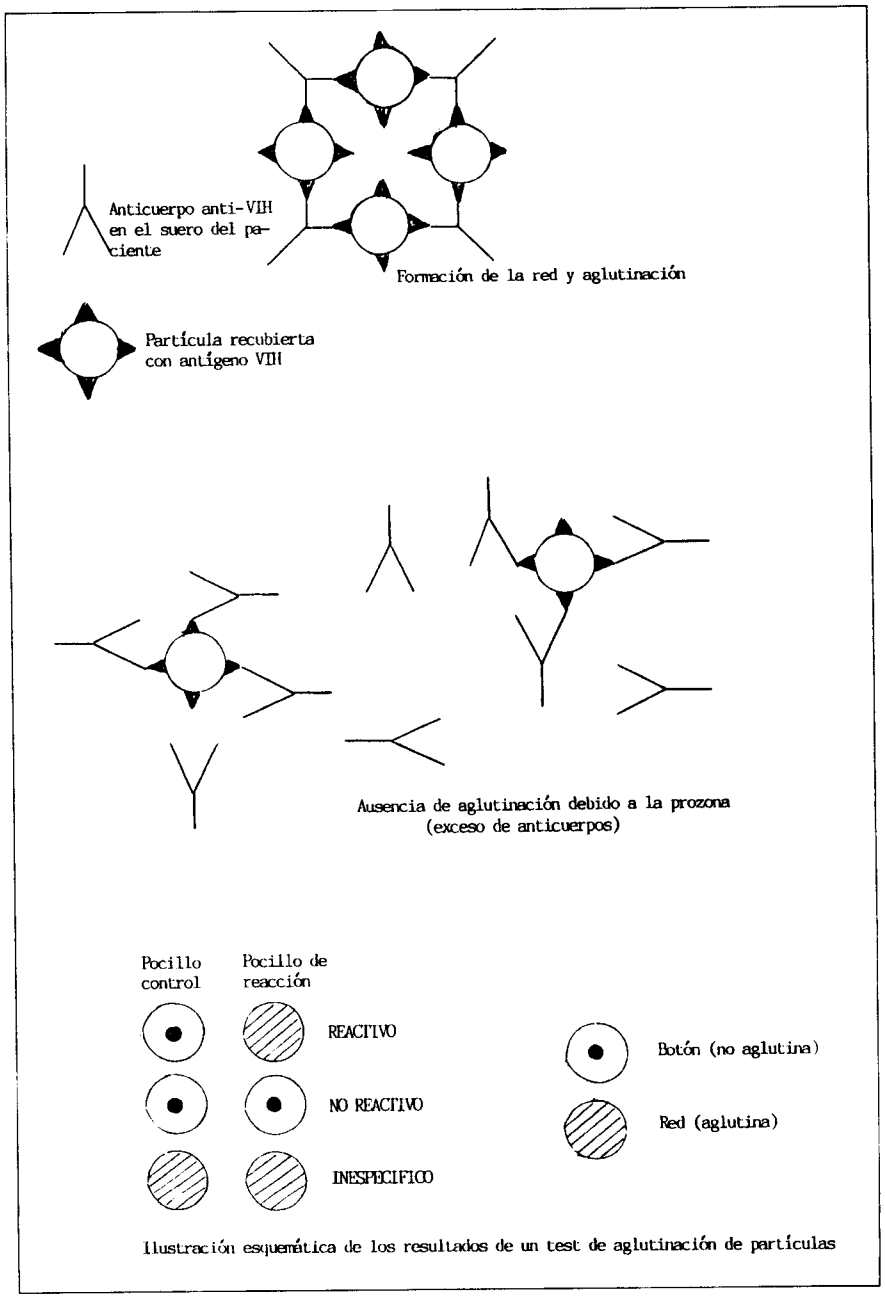


Figura 4: Aglutinación de partículas

Uno de los problemas que presenta este tipo de pruebas es el fenómeno de prozona. Este fenómeno se produce con muestras que contienen altos niveles de anticuerpos que pueden bloquear la reacción, generando resultados falsos negativos.

Si las muestras con exceso de anticuerpos son diluídas las reacciones se vuelven positivas, por lo que es importante que el laboratorio contemple estas posibilidades.

La prueba de aglutinación es fácil de realizar, no requiere equipamiento adicional y se obtienen resultados en poco tiempo. Las reacciones pueden ser observadas directamente o por medio de una lupa. En el caso de reacciones débiles, la interpretación suele hacerse más dificultosa por lo que es importante ser cuidadoso en la observación del resultado de la reacción antes de considerar una muestra como no reactiva.

En el caso de la aglutinación de partículas de gelatina, algunas muestras de suero o plasma pueden aglutinar en forma inespecífica con las partículas no sensibilizadas (reacciones inespecíficas). En estos casos se requiere la adsorción de la muestra con partículas no sensibilizadas antes de su procesamiento final.

3.1.3 Inmuno dot (dot blot)

Son metodologías serológicas en las cuales los antígenos virales se encuentran unidos a una membrana de nitrocelulosa dentro de un contenedor plástico. En general los antígenos utilizados son recombinantes o sintéticos.

La reacción sigue los principios de un enzimoinmunoensayo siendo más rápidos y fáciles de realizar. Son útiles para laboratorios que procesan un bajo número de muestras.

3.1.4 Selección de una prueba para tamizaje

Todos los métodos antes mencionados se utilizan habitualmente como pruebas de tamizaje. En general poseen buena sensibilidad y sus resultados son reproducibles aunque no están libres de resultados falsos positivos. Esto implica que no todos los sueros reactivos en una de estas pruebas sean verdaderamente positivos.

Es importante considerar el **valor predictivo** de un resultado. Este valor depende de la seroprevalencia en la población estudiada y de las características del ensayo utilizado. **El valor predictivo positivo se define como la probabilidad que tiene un individuo de estar infectado cuando ha sido reactiva la prueba utilizada.**

El valor predictivo negativo es la probabilidad de no tener la infección que detecta la prueba cuando el resultado de la misma es no reactivo. En poblaciones de baja prevalencia los valores predictivos positivos son siempre reducidos aunque el ensayo utilizado tenga una sensibilidad cercana al 100%.

En la selección de las pruebas y los equipos comerciales de diagnóstico para tamizaje deben considerarse una serie de factores:

a. Algunas situaciones requieren el uso de pruebas sencillas (con o sin instrumental) mientras que en otras pueden necesitarse sistemas más complejos de automatización. En este punto debe considerarse el grado de complejidad o nivel tecnológico del laboratorio y el volumen de muestras que se procesan.
b. Capacidad para la conservación apropiada de los equipos comerciales (heladeras, congeladoras, etc).
c. En los bancos de sangre debe considerarse el uso de equipos comerciales de diagnóstico de alta sensibilidad a fin de detectar el mayor número posible de donantes positivos.
d. En situaciones de diagnóstico los equipos comerciales elegidos deben tener un alto valor predictivo.
e. En algunas regiones donde pueda existir infección por VIH-2, debe considerarse la utilización de equipos comerciales mixtos con antígenos para VIH-1 y VIH-2.

La elección de un equipo comercial de dignóstico depende de situaciones y necesidades propias de cada laboratorio. Sin embargo, para obtener resultados confiables **deben utilizarse sólo equipos comerciales aprobados por organismos nacionales competentes para el control de calidad de los mismos.**

3.2 Pruebas suplementarias o de confirmación

Esta segunda etapa en el diagnóstico de la infección por VIH surge como consecuencia de la relativa especificidad de las pruebas que habitualmente se usan en el tamizaje.

Las implicancias que acompañan a un resultado positivo (sociales, psicológicas, económicas) llevan a la necesidad de confirmar siempre los resultados de un tamizaje.

Las pruebas suplementarias se caracterizan por tener alta especificidad y si son realizadas e interpretadas correctamente no debe-

rían producir resultados falsos positivos. Sin embargo, no siempre producen resultados definitivos (positivos o negativos) y en estos casos es necesario realizar estudios adicionales.

3.2.1 Western blot (WB)

Esta prueba es la más difundida y aceptada como confirmatoria en el diagnóstico serológico de infección por VIH. Posee una sensibilidad comparable a la de las pruebas de tamizaje.

El WB posee alta especificidad debido a que los antígenos virales están separados en bandas específicas de alta pureza.

Por otra parte la separación de los antígenos permite identificar anticuerpos específicos contra cada una de las proteínas virales.

El principio de la metodología se puede describir en tres etapas:

a. Separación por electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS) de antígenos virales lisados.
b. Transferencia (blotting o electrotransferencia) de los antígenos separados a membranas de nitrocelulosa.
c. Análisis del suero problema directamente sobre la membrana usando una técnica similar al enzimoinmunoensayo.(fig 5).

En la práctica, los equipos comerciales de Western blot vienen preparados para realizar sólo esta última etapa. Si bien son sencillos de realizar se requiere seguir estrictamente las indicaciones del fabricante y realizar una adecuada interpretación de los resultados.

Los antígenos virales presentes habitualmente en las tiras de nitrocelulosa son los siguientes: gp160, gp120, p66, p55, p51, gp41, p31, p24, p17 y p15.

Es importante recordar que en algunos casos pueden presentarse otras bandas proteicas que no corresponden a proteínas virales. En general éstas provienen de las células donde se desarrolló el virus.

El procedimiento se inicia incubando las tiras de nitrocelulosa con las muestras de suero diluídas, en contenedores de plástico individuales.

Se debe tener sumo cuidado para evitar salpicaduras que contaminen tiras cercanas generando resultados falsos.

En la mayoría de los casos existe una incubación previa de la

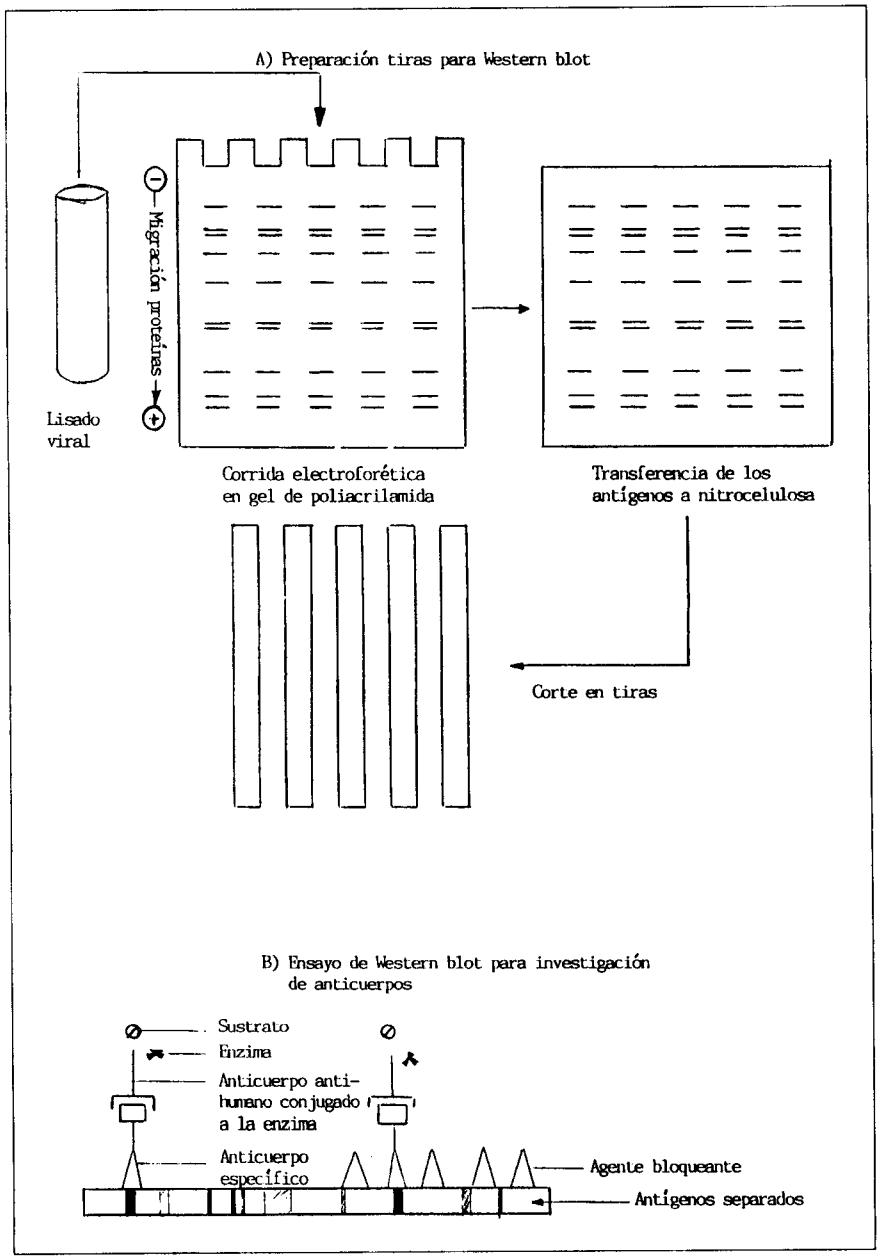


Figura 5: Fundamentos del Western Blot
A) Realizado por fabricante.
B) Realizado rutinariamente en el laboratorio.

tira con una solución bloqueante (generalmente de albúmina o leche en polvo) que evita la unión inespecífica de las inmunoglobulinas del suero.

Durante la incubación de la muestra, los anticuerpos anti VIH se unirán a los antígenos correspondientes y, al igual que en el enzimoinmunoensayo, los lavados remueven los anticuerpos no unidos.

Luego se agrega un conjugado, se incuba y se lava nuevamente. Los conjugados más comunes son inmunoglobulinas anti IgG humanas unidas a una enzima. En otros casos el conjugado puede consistir en dos componentes separados; una inmunoglobulina antihumana unida a biotina (conjugado 1) y una proteína (derivada de streptococcus) llamada avidina unida a una enzima (conjugado 2).

La ventaja del sistema avidina-biotina es que incrementa la sensibilidad del ensayo ya que varias moléculas de biotina se unen a una de avidina aumentando la señal en el revelado.

Un sustrato es agregado al final de la reacción para lograr la visualización de las bandas reactivas.

Al igual que en otras pruebas deben procesarse los controles correspondientes. En la lectura es importante el alineamiento correcto de las tiras control con las correspondientes a las muestras ensayadas para lograr una correcta determinación de las bandas presentes. La intensidad de las mismas debe compararse con el control positivo débil (mínima intensidad requerida para una banda).

Interpretación de los resultados

Si bien la lectura del WB establece el resultado final -es actualmente el estándar de referencia de la serología para VIH- existen, sin embargo, diferentes criterios para su interpretación. Estos criterios han sido establecidos por distintos organismos, no habiendo actualmente un consenso internacional al respecto.

Sin embargo, uno de los criterios más aceptados es aquel recomendado por el Centro de Control de Enfermedades de Atlanta EEUU (CDC) y la Asociación de Directores de Laboratorios Estatales de Salud Pública (ASTPHLD).
Este criterio establece:

Western blot POSITIVO: Presencia de por lo menos 2 de las siguientes bandas p24, gp41, gp120/160.

Western blot NEGATIVO: Ausencia total de bandas.
Western blot INDETERMINADO: Presencia de cualquier banda sin que se cumpla el criterio de positividad.

3.2.2 Inmunofluorescencia indirecta (IFI)
Este ensayo utiliza como soporte antigénico células infectadas. Su lectura requiere la utilización del microscopio de inmunofluorescencia.

Las células infectadas (linfocitos T) están fijadas a portaobjetos de vidrio. Como control de inespecificidad se utilizan células no infectadas que pueden estar en el mismo pocillo o en pocillos separados.

La metodología implica una incubación de la muestra sérica con las células infectadas y no infectadas, seguido de un lavado con solución salina (PBS) y el agregado de un conjugado (anti-IgG humana conjugada con isotiocianato de fluoresceína FITC). Esta sustancia expuesta a la luz ultravioleta del microscopio produce fluorescencia y permite evidenciar la reacción de los anticuerpos con los antígenos virales presentes en el citoplasma y membranas celulares.

A diferencia del Western blot, la inmunofluorescencia no permite discriminar anticuerpos dirigidos contra antígenos determinados y un resultado positivo sólo indica la presencia de anticuerpos anti VIH. La intensidad de la fluorescencia debe ser graduada desde débil a fuerte por lo que es importante ensayar controles apropiados. No debe observarse reacción en las células no infectadas.

La principal desventaja que posee el método es que requiere de personal bien entrenado y experimentado en la visualización e interpretación de los resultados.

En la práctica la IFI permite bajar los costos del diagnóstico ya que puede reemplazar al Western blot. Sin embargo la utilización del WB sigue siendo necesaria ya que tanto las reacciones inespecíficas como las lecturas poco claras deben ensayarse nuevamente por este método.

En la experiencia de los laboratorios de referencia las muestras provenientes de un tamizaje discordante (dos ensayos con resultados diferentes) tienen alta probabilidad de generar resultados de difícil interpretación. En estos casos se recomienda realizar directamente el ensayo de Western blot.

Las muestras que presentan baja reactividad por ELISA son habitualmente negativas por IFI y por consiguiente su confirmación

se hace directamente por WB. Si el resultado de la IFI es negativo debe realizarse WB.

La utilización de la inmunofluorescencia como técnica de tamizaje no es recomendable ya que posee menor sensibilidad que las pruebas destinadas para tal fin.

3.2.3 Inmunoensayo de línea (LIA)

Se trata de una prueba que utiliza péptidos recombinantes y sintéticos del VIH-1 (gp41, p31, p24 y p17) y del VIH-2 (gp36). Cada péptido forma una delgada banda en forma de línea sobre un soporte sólido. En la tira se añaden además bandas de control de suero y de valor de corte. El procedimiento se realiza siguiendo los mismos pasos que una prueba de WB.

Debido a que esta prueba no incluye todos los antígenos presentes en el WB su uso como método confirmatorio puede resultar limitado en algunos casos.

3.2.4. Prueba de radioinmunoprecipitación (RIPA)

Las proteínas virales radioactivas se obtienen a partir de un cultivo viral al que se le adicionan aminoácidos marcados con isótopos radioactivos. Las partículas virales son lisadas y adicionadas al suero problema. La RIPA se basa en la inmunoprecipitación de los complejos formados por las proteínas virales y los anticuerpos del suero del paciente. Los inmunocomplejos -proteínas/anticuerpos- son purificados y separados mediante electroforesis en gel de poliacrilamida y finalmente detectados a través de la autoradiografía del gel.

Esta prueba es apta sólo para ser realizada por laboratorios de alta complejidad.

3.3 Pruebas suplementarias adicionales

Estas pruebas están indicadas para resolver situaciones donde los métodos descriptos previamente no permiten llegar a un diagnóstico definitivo.

Las pruebas usadas habitualmente son:

Determinación de antigenemia p24
Aislamiento viral
Reacción en cadena de polimerasa (PCR)

Estos estudios están indicados para:

a.- pacientes seronegativos que han tenido contacto reciente con personas VIH positivas confirmadas.
b.- evaluación de la evolución de la enfermedad o tratamiento de un paciente VIH positivo.
c.- individuos con sintomatología sospechosa no confirmada por la presencia de anticuerpos anti-VIH (serología indeterminada).
d.- confirma la infección en niños nacidos de madre VIH positiva.

3.4 Algoritmo diagnóstico

Algoritmo es el orden de las etapas sucesivas que deben realizarse en el procedimiento diagnóstico. La mayoría de los algoritmos utilizados contemplan los niveles de tamizaje y confirmación.

La elección del algoritmo depende de tres criterios: finalidad del estudio, sensibilidad y especificidad de la prueba que se emplea y prevalencia de la infección por VIH en la población en estudio.

La estrategia de uso más general para detectar anticuerpos contra el VIH emplea pruebas de ELISA o aglutinación seguidas de la prueba de Western blot.

Distintos estudios proponen el uso de combinaciones de ELISA y/o de pruebas rápidas y sencillas (inmunodot, pruebas de aglutinación) con resultados confiables a un costo muy inferior que la combinación ELISA/WB. Por lo tanto la OMS ha recomendado que los países estudien la posibilidad de aplicar estrategias para pesquisar anticuerpos contra el VIH en las que se empleen la prueba de ELISA y/o pruebas rápidas en lugar de la combinación ELISA/WB.

El algoritmo recomendado por el Centro Nacional de Referencia para el SIDA figura en el anexo 1.

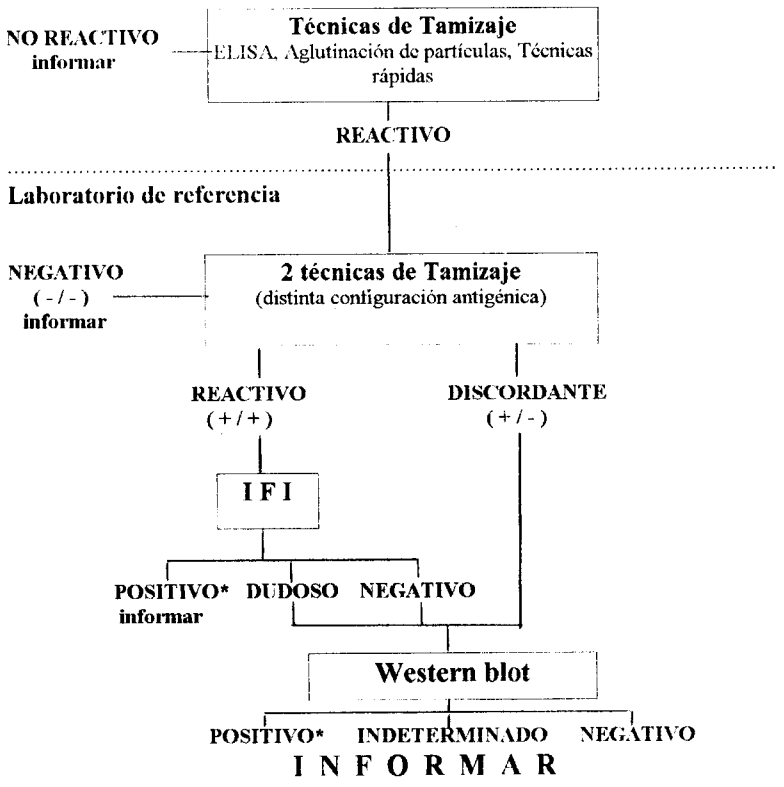
En el laboratorio periférico se realiza una prueba de tamizaje. Si el resultado de la prueba es no reactivo, se informa. Si es reactivo se deriva la muestra a un laboratorio de referencia para su confirmación.

En el laboratorio de referencia se realizan dos pruebas de tamizaje de distinta configuración antigénica. Si el resultado de ambas pruebas es no reactivo, se informa. Si ambas son reactivas, los laboratorios que cuenten con la prueba de IFI realizarán esta prueba como

ANEXO I

ALGORITMO PARA EL DIAGNOSTICO SEROLOGICO DE LA INFECCION POR VIH

Laboratorio Periférico - Banco de Sangre



* No se debe informar un resultado positivo sin antes extraer una nueva muestra al paciente y procesarla con una prueba de tamizaje a los efectos de descartar posibles errores.

confirmación. Si el resultado de la IFI es positivo, se informa.

Cuando el resultado de las pruebas de tamizaje es discordante o el resultado de la IFI es inespecífico o negativo, se realiza la prueba

de WB como confirmación. Cualquiera sea el resultado del WB, se informa. En caso de que el laboratorio de referencia no cuente con la prueba de IFI, los resultados discordantes o reactivos de las pruebas de tamizaje se confirmarán con WB.

4. PROGRAMA DE GARANTIA DE CALIDAD

La calidad del diagnóstico de laboratorio está dada por la validez y confiabilidad de sus resultados.

La validez de estos resultados depende de las medidas empleadas **ANTES, DURANTE** y **DESPUES** de cada prueba.

La relevancia del diagnóstico de la infección por VIH lleva a la necesidad de establecer programas de garantía de calidad que eviten tanto las consecuencias de resultados falsos positivos como de falsos negativos.

Un individuo falsamente diagnosticado como negativo puede, por desconocimiento, transmitir la infección a otros individuos. Por otra parte, un diagnóstico falso positivo puede tener serias consecuencias psicosociales.

La garantía de la calidad de los resultados requiere de un programa **de garantía de calidad (quality assurance)**

4.1 Garantía de calidad

Se define como garantía de calidad a **un programa global que asegure la calidad de los resultados informados por el laboratorio.** Esto incluye todos los parámetros que afectan los resultados de las pruebas y su informe final.

La garantía de calidad depende de un buen control de calidad y es verificada por una buena valoración externa de calidad. Además implica el cumplimiento de las siguientes recomendaciones:

- Idoneidad del personal.
- Calidad de los equipos comerciales de diagnóstico y del equipamiento.
- Condiciones de la muestra a analizar.
- Validez de los controles usados en las pruebas.
- Correcta interpretación de los datos aportados por las pruebas.

- Llevar libros y archivos computarizados con los datos de la muestra.
- Mantener estos datos en forma confidencial de acuerdo con las leyes vigentes y/o recomendaciones internacionales.
- Verificar la transcripción de los resultados.
- Confeccionar los informes y volver a verificar la transcripción de los resultados.
- Utilizar la correcta denominación del resultado según sea la técnica utilizada (reactivo-positivo).
- Entrega de los resultados de acuerdo con la legislación o normas vigentes.
- Mantenimiento de alícuotas de las muestras para eventuales repeticiones.

4.2 Control de Calidad. (quality control)

Son todos los procedimientos que deben incluirse en una prueba para verificar que se efectuó correctamente. La realización adecuada de los procedimientos de control permite asegurar la validez del resultado obtenido en la prueba.

El control de calidad debe cumplir con las siguientes normas:

- Correr en cada prueba los controles del equipo comercial indicados por el fabricante.
- Correr en cada prueba un control positivo y uno negativo preparado en el propio laboratorio o en los laboratorios de referencia.
- Tratar a estos controles de la misma manera que a una muestra, corriéndolos en forma simultánea y utilizando los mismos criterios para la interpretación de los resultados.
- Repetir toda prueba cuando los controles no cumplen los criterios de validez dados por el fabricante.
- No usar un equipo comercial de diagnóstico más allá de su fecha de vencimiento.
- Respetar parámetros tales como diluciones, tiempo y temperatura de incubación.
- Verificar que la muestra sea la adecuada.
- Descartar sueros lipémicos, hemolizados o contaminados.
- Usar preferentemente suero o plasma frescos, o conservados adecuadamente.

- Asegurarse del correcto rotulado de los tubos.
- Asegurarse del correcto funcionamiento del instrumental: calibración de pipetas, limpieza de filtros de espectrofotómetro, correcta longitud de onda para la lectura de resultados.
- Asegurarse la limpieza de todo el material a utilizar.
- Utilizar un formulario especial, según la prueba a realizar, para registrar los resultados.
- Verificar la transcripción de los resultados.

4.3 Valoración externa de la calidad (quality assessment)

Se refiere a un conjunto de procedimientos destinados a evaluar la eficiencia del control de calidad en los laboratorios participantes del programa.

Este sistema no puede reemplazar el control de calidad, sino está destinado a detectar errores en el sistema de control de calidad del laboratorio.

Los procedimientos de control externo más utilizados y recomendados son:

a. Verificación de resultados

Consiste en el envío de muestras -previamente analizadas por el laboratorio periférico- al laboratorio de referencia a los efectos de cotejar los resultados obtenidos por ambos laboratorios. Este método tiene como ventaja que el control puede efectuarse sobre un número considerable de muestras.

Debe, sin embargo, asegurarse de que las condiciones de envío sean aceptables para garantizar la estabilidad de las muestras hasta el momento de la recepción por el laboratorio de referencia.

b. Control externo con paneles de sueros

En este sistema el laboratorio de referencia prepara los paneles de sueros control y garantiza la estabilidad de las muestras enviadas a los laboratorios controlados.

Los laboratorios participantes deben analizar estos sueros control junto con sus muestras de rutina y remitir los resultados al laboratorio de referencia.

El laboratorio de referencia evaluará los resultados remitidos por los participantes de manera confidencial y elaborará un resumen del estado global del control de calidad en la red de laborato-

rios participantes. Asimismo remitirá a cada laboratorio un informe de evaluación individual que detalle los eventuales errores y las posibles sugerencias para corregirlos.

Este sistema tiene la ventaja de asegurar la calidad de las muestras control, pero se encuentra limitado en el número de las mismas. En ambos casos los controles deben ser realizados bajo un programa de evaluación con una frecuencia adecuada (se recomienda una frecuencia semestral).

c. Auditorías

Las auditorías deberán revisar los aspectos organizativos, los métodos analíticos y los procedimientos de control de calidad establecidos. El resultado de la visita al laboratorio deberá constar en un informe final escrito.

5. BUENAS PRACTICAS DE LABORATORIO

El conjunto de prácticas que se desarrollan en el laboratorio, desde la recolección de muestras hasta la producción de un informe, debe cumplir con las normas de las buenas prácticas de laboratorio. Este requisito es fundamental para el logro de una adecuada calidad en el diagnóstico.

Dichas normas se refieren a la composición y organización del personal del laboratorio, la selección de las metodologías a utilizar, el mantenimiento del instrumental y accesorios, el control de los equipos comerciales de diagnóstico, la recolección y conservación de las muestras, el registro de resultados, la producción de informes y las medidas de bioseguridad.

Para garantizar la calidad a lo largo del tiempo, es necesario que todas las tareas del laboratorio sean definidas y desarrolladas cuidadosamente.

5.1 Organización y Selección del Personal

El tamaño del laboratorio y el volumen de trabajo son los principales determinantes de la cantidad de personal necesario. Pero tal vez, más importante que el número de integrantes, es la organización de los mismos para asegurar el correcto desarrollo de las funciones que deben ser cumplidas.

El departamento, servicio, o persona encargada del control de calidad debe depender de la Dirección del laboratorio y ser independiente de las áreas de diagnóstico o producción. Esto es una condición necesaria para ejercer con independencia su función.

La conducción del laboratorio debe estar a cargo de un profesional, acompañado de un equipo de profesionales y/o técnicos según las necesidades del laboratorio. Asimismo, las distintas áreas de trabajo estarán integradas por un profesional responsable y uno o más técnicos.

Además de que el personal técnico sea calificado, debe asegu-

rarse su adecuado entrenamiento antes de hacerlo responsable de tareas independientes, siendo ésto responsabilidad de la conducción del laboratorio.

Debe asegurarse la capacitación contínua de todo el personal a través de cursos, talleres, seminarios o pasantías de entrenamiento.

5.2 Guías de Procedimientos

Las guías de procedimientos son descripciones escritas y sumarias de los distintos procedimientos y técnicas utilizadas en el laboratorio.

Las guías de procedimientos constituyen un elemento muy importante en los programas de garantía de calidad. Estos documentos permiten a una auditoría externa, un rápido análisis de la operativa del laboratorio. Son indispensables en el entrenamiento del personal y permiten verificar el funcionamiento de los procedimientos frente a la aparición de dificultades.

Los laboratorios deben tener a disposición del personal guías de procedimiento que contengan una descripción clara de las siguientes áreas:

- Tipo de muestra, recepción y manejo de las mismas.
- Algoritmo diagnóstico a seguir.
- Desarrollo de los procedimientos técnicos de rutina.
- Preparación de los reactivos necesarios.
- Uso del instrumental.
- Limpieza y descontaminación del laboratorio.
- Medidas de bioseguridad.
- Interpretación, registro e informe de resultados.
- Procedimientos de control de calidad.

5.3 Mantenimiento y Control del Instrumental y Accesorios

Debe existir un control programado del instrumental y accesorios a fin de garantizar su correcto funcionamiento. Este control debe ser realizado en forma periódica y regular, aún cuando se encuentren funcionando satisfactoriamente y su resultado debe registrarse adecuadamente en cartillas diseñadas al efecto.

DESTILADOR o DESIONIZADOR: La limpieza o recambio de la columna deberá ser efectuada según las instrucciones del fabri-

cante y teniendo en cuenta el tipo de agua que llega al laboratorio.

HELADERAS y CONGELADORAS: Control de conexiones eléctricas y descongelamiento periódico según instrucciones del fabricante.
Control y registro diario de la temperatura.

BAÑOS TERMOSTATICOS: Limpieza y recambio del agua desionizada, control y registro diario de la temperatura.

AUTOCLAVES: Limpieza, control de conductos y conexiones de gas, control del mecanismo de cierre y de seguridad. Pruebas químicas de esterilización en cada ciclo y biológicas una vez al mes.

MICROSCOPIOS: Limpieza y calibración de sus sistemas ópticos, mecánicos y eléctricos. Control de longitud de onda de la fuente de luz.

LAVADORES PARA ELISA: Control de la bomba de aspiración, tubuladuras, calibración de volúmenes dispensados. Control mecánico.

ESPECTROFOTOMETROS: Control de filtros, calibración de la fuente de luz.

BALANZAS DE PRECISION: Limpieza y calibración.

PIPETAS Y MICROPIPETAS: Calibración volumétrica y lubricación.

5.4 Mediciones con pipetas

5.4.1 Uso de pipetas de vidrio: Tienen un rango de medición de 0,2 a 25 ml y son utilizadas generalmente para hacer diluciones y reconstituir reactivos.

Se debe cumplir con las siguientes recomendaciones para su uso:

- jamás pipetear con la boca
- usar propipetas mecánicas o eléctricas
- siempre usar pipetas perfectamente limpias
- la absorción y expulsión de líquidos debe hacerse lentamente con la punta de la pipeta apoyada a la pared del tubo
- medir el enrase con la pipeta en posición vertical y el menisco a la altura de los ojos del operador

5.4.2 Uso de pipetas mecánicas: Tienen un rango de medición de 0,5 µl a 1 ml y pueden ser de canal simple o múltiple (8-12 canales). Son utilizadas para medir pequeños volúmenes con gran precisión.

Siempre se debe:

- probar el correcto estado de funcionamiento con tips calibrados.
- controlar la adecuada inserción de los punteros (tips).
- evitar la formación de burbujas. Se deben absorber lentamente los líquidos con el émbolo desplazado hasta el primer tope y expelerlos también lentamente con la punta apoyada en la pared (no en el fondo) del tubo o pocillo (fig 6).
- evitar que la columna líquida tome contacto con el extremo de la micropipeta (contaminación cruzada).

5.5 Registro de Datos

5.5.1 Registro de ingreso y codificación de la muestra: Debe hacerse en forma inmediata al recibir la muestra. Es conveniente que exista una etapa o sistema de control del rotulado y asignación de código. Cada muestra ingresada debe ser incorporada a algún sistema de registro (libros, fichas, etc) incluyendo los siguientes datos mínimos:

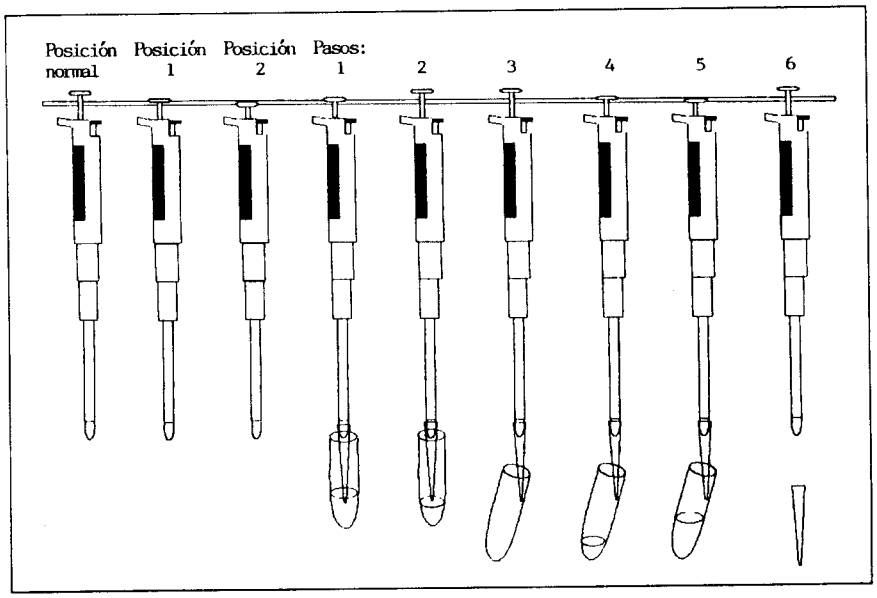


Figura 6: Manejo de pipeta manual de un canal.

- datos identificatorios que mantengan la confidencialidad.
- procedencia
- médico o institución solicitante

5.5.2 Protocolo de trabajo: Son planillas confeccionadas para ser utilizadas en la realización de las pruebas. Deben contener la fecha, tipo y lote de reactivos usados, la posición de las muestras en la prueba, valores de referencia (valor de corte), quién realizó el procedimiento y las lecturas de densidad óptica en los ensayos de ELISA.

En el caso de otros procedimientos (aglutinación, WB, IFI, etc.) registrar la lectura de acuerdo con los patrones de referencia. (Anexo 2)

5.5.3 Registro e informe de los resultados: Los resultados deben ser volcados en el libro de registro de ingreso y codificación de la muestra.

El informe final debe cumplir con las siguientes condiciones:

- No debe ser entregado al paciente ni a ninguna otra persona que no haya sido debidamente autorizada por el médico tratante o la institución solicitante.
- Debe asegurarse la confidencialidad del resultado y de la identidad del paciente.
- Deben figurar detalladamente las técnicas utilizadas.
- Es recomendable incluir aclaraciones sobre la interpretación o el significado de los resultados informados.

Se recomienda archivar todos los registros y conservarlos por tiempo indefinido en forma confidencial.

5.6 Errores técnicos comunes

- *Errores en las diluciones:* Las diluciones deben ser calculadas y realizadas cuidadosamente tanto para las muestras como para todos los componentes del equipo diagnóstico. La mayoría de los equipos comerciales de diagnóstico de ELISA contienen instrucciones para la realización de las diluciones, sin embargo, muchas de éstas están establecidas para los volúmenes requeridos por placa. En las situaciones en las que se trabaja con pequeño número de muestras los volúmenes requeridos difieren aunque las proporciones deben ser respetadas.
- *Tocar el soporte antigénico al agregar la muestra:* Este es un pro-

blema común en pruebas de ELISA e IFI y debe ser evitado ya que puede eliminar los antígenos o células que intervienen en la reacción.

- *Uso de tips inapropiados:* Deben utilizarse tips diseñados para las micropipetas en uso a fin de evitar imprecisiones en los volúmenes dispensados.
- *Uso inapropiado de goteros:* En general los equipos de aglutinación y dot blot están provistos de los goteros adecuados. Para el correcto uso de los mismos debe permitirse la libre caída de la gota, evitando la colaboración de las superficies e impidiendo la formación de burbujas. Se desaconseja el uso de goteros cuando los mismos no son provistos por el fabricante del equipo o como reemplazo de micropipetas.
- *Temperatura inapropiada de conservación y uso del equipo comercial de diagnóstico o de la muestra:* Se debe respetar estrictamente la temperatura de conservación indicada en el rótulo de cada equipo diagnóstico y la temperatura de conservación de la muestra debe ajustarse al momento en que será ensayada. Todos los reactivos y muestras deben estar a temperatura ambiente en el momento de realizar la prueba. Agregar solución de conjugado fría en un prueba de ELISA puede alterar severamente la cinética de la reacción y producir resultados erróneos.
- *Mezclar componentes reactivos de diferentes lotes:* Los reactivos de cada lote están titulados para interactuar en forma óptima. Algunos reactivos pueden variar su concentración en diferentes lotes. El uso de mezclas de reactivos puede alterar la eficiencia de la reacción.
- *Uso inapropiado del instrumental:* Debe asegurarse el correcto uso de incubadoras, lavadores, espectrofotómetros, agitadores, fuente ultravioleta del microscopio de fluorescencia y todo el equipamiento necesario para la realización de las pruebas.
- *Mal cálculo del valor de corte:* Se debe realizar de acuerdo con las instrucciones precisas del fabricante de cada equipo diagnóstico.

6. RECOMENDACIONES DE BIOSEGURIDAD PARA LABORATORIOS DE DIAGNOSTICO

El personal de laboratorio que maneja material biológico potencialmente contaminado con VIH, u otros agentes de enfermedades transmitidas por sangre como los virus de la hepatitis B y C , está expuesto a accidentes que puedan poner en riesgo su salud. Las normas de bioseguridad están destinadas a proteger al personal de este tipo de accidentes.

El riesgo de infección con el VIH en el laboratorio está referido primariamente a la contaminación por injuria penetrante causada por objetos punzocortantes. También constituye un riesgo a tener en cuenta la salpicadura de las mucosas (bucal, ocular o nasal) con sangre o fluidos corporales de personas infectadas.

Datos actuales indican que el riesgo de infección por el VIH en trabajadores de laboratorio es baja. Sin embargo, del total del personal de salud, el 22 % de los casos reportados de infecciones accidentales por VIH corresponden a personal de laboratorio.

El riesgo de infección después de un accidente por punción percutánea con una aguja con sangre contaminada con VIH está estimado entre 0,13% a 0,50%, mientras que el riesgo de infección por el virus de la hepatitis B después de una exposición similar, está calculado en un 26%. Dado que no existe vacuna alguna que prevenga la infección por VIH las prácticas seguras de trabajo son la única protección con que se cuenta por el momento.

Las normas de bioseguridad deben implementarse en forma permanente y universal considerando que **todo material biológico es potencialmente infeccioso.**

Algunas definiciones importantes a tener en cuenta son:

Autocuidado: Es el compromiso de cada individuo o grupo de trabajo de mantener su integridad mediante el uso y cumplimiento de normas de bioseguridad en el proceso de trabajo.

Bioseguridad: Evoca el concepto de protección de la vida, situación que puede lograrse en parte evitando accidentes.
Descontaminación: Inactivación de gérmenes mediante el uso de agentes físicos y/o químicos para protección del operador.
Esterilización: Destrucción de todo tipo de microorganismos incluyendo los esporos.
Lavado: Remoción de la materia orgánica de cualquier superficie mediante la acción mecánica del agua y el detergente.

Las situaciones de riesgo más frecuentes en el laboratorio son:

Autoinoculación accidental debida a pinchazos o cortes con agujas, pipetas, bisturíes u otros elementos punzantes.
Exposición de la piel o mucosas a sangre, hemoderivados u otros fluidos biológicos contaminados especialmente cuando la permeabilidad de la piel y mucosas se encuentra alterada por heridas, escoriaciones, eczemas, lesiones herpéticas, conjuntivitis o quemaduras.
Exposición a aerosoles producidos al agitar muestras, destapar tubos, expulsar la última gota de una pipeta o durante la centrifugación, especialmente si se emplean tubos abiertos con mayor volumen del aconsejado por el fabricante o cuando la centrífuga es frenada abruptamente.
Salpicaduras en los ojos.
Aspiración bucal.

Cada laboratorio de diagnóstico o institución de salud debe formular, implementar y evaluar periódicamente un programa de bioseguridad. Además, es necesaria la designación de encargados responsables de controlar la seguridad, la instrucción y el entrenamiento sobre bioseguridad de todas las personas que trabajen o ingresen a dicho lugar.

6.1 Recomendaciones generales

- Todos los materiales usados en el laboratorio deberán ser adecuadamente descontaminados. Dichos elementos serán posteriormente desechados. Si van a ser reutilizados deben ser lavados, secados y/o esterilizados, según los requisitos que deban reunir.

- La extracción de sangre debe hacerse **SIEMPRE CON GUANTES DE LATEX** y debe ponerse especial cuidado en la manipulación posterior de las jeringas y agujas hasta que se las deseche en la solución descontaminante.
- Precauciones de trabajo.

a. Las puertas del laboratorio deberán estar cerradas y el acceso al mismo deberá estar restringido. La puerta deberá portar emblemas que digan **PROHIBIDO PASAR-PELIGRO BIOLOGICO.**
b. El laboratorio deberá mantenerse limpio, ordenado y libre de materiales extraños.
c. No se permitirá comer, beber, fumar o almacenar comidas así como también el uso de cualquier otro elemento personal (cosméticos) dentro del área de trabajo.
d. Usar uniforme de trabajo dentro del laboratorio. Esta ropa protectora deberá quitarse inmediatamente antes de abandonar el área de trabajo.
e. Antes de iniciar la tarea diaria asegúrese que la piel de sus manos no presente cortes, raspones u otras lastimaduras. De ser así, cubrir la herida de manera conveniente antes de colocarse los guantes.
f. Usar guantes de látex de buena calidad para todo manejo de material biológico o cuando exista, aunque sea de manera potencial, el riesgo de exposición a sangre o fluídos corporales.
g. Cambiar los guantes de látex toda vez que hayan sido contaminados, lavarse las manos y ponerse guantes limpios.
h. No tocar los ojos, nariz o piel con las manos enguantadas.
i. No abandonar el laboratorio o caminar fuera del lugar de trabajo con los guantes puestos.
j. El uso de agujas, jeringas y cualquier otro instrumento similar deberá restringirse a lo indispensable. Las agujas y otros elementos punzantes deben descartarse en un recipiente resistente. Se evitarán los intentos de reencapuchar, romper o doblar las agujas.
k. Todos los procedimientos deberán realizarse evitando la formación de aerosoles, gotas, salpicaduras, etc.
l. Bajo ninguna circunstancia se pipeteará con la boca, para ello se usarán pipeteadores automáticos.
m. Las superficies del área de trabajo deberán ser descontaminadas cuando se termine la tarea diaria usando, para tal efecto, una solución descontaminante adecuada.

n. El recipiente para descontaminar especímenes deberá contar con tapa de seguridad para el traslado fuera del lugar de trabajo. En ese caso el exterior del recipiente deberá mantenerse libre de toda contaminación con sangre u otro fluido corporal usando solución descontaminante.
ñ. El descarte de los fluidos orgánicos puede efectuarse por las cañerías habituales, una vez que éstos hayan sido convenientemente descontaminados.
o. Una vez usados los guantes de látex deberán colocarse dentro del recipiente con solución descontaminante.
p. Lavarse las manos con agua y jabón inmediatamente después de que el trabajo haya sido terminado.
q. Informar inmediatamente al superior de cualquier accidente en el laboratorio.
r. Los escritorios, ficheros y todo tipo de papeles deberán ubicarse fuera del área en la que se trabaje con material biológico.
s. No se retirará ningún material del lugar de trabajo sin previa descontaminación del mismo.
t. Previo al ingreso de cualquier persona que deba realizar tareas de mantenimiento, el personal responsable del área deberá asegurarse que ésta esté perfectamente descontaminada.
u. Uso de aparatos y otros elementos

Congeladoras y heladeras: Cada vez que deba guardarse o retirarse material alguno el operador deberá tener puestos los guantes. Todo el material almacenado deberá estar rotulado, limpio por fuera y cerrado adecuadamente (no con tapón de algodón o gasa).

Centrífuga:
- No detenerla manualmente.
- No destaparla antes de que cese de girar.
- Emplear tubos con tapa hermética (tapa de rosca o de goma).

Preferentemente la centrifugación deberá hacerse bajo campana. Luego de transcurridos 10 min. de la detención se procederá a abrirla. Al terminar el trabajo limpiar con solución descontaminante por dentro y por fuera del aparato.

Otros aparatos: (microscopios, lectores de ELISA, etc.) Una vez utilizados deberán descontaminarse las perillas y superficies con

solución descontaminante. La manipulación de portaobjetos durante las pruebas de inmunofluorescencia deberá hacerse con pinzas y el operador deberá tener puestos los guantes.

6.2 Proceso de descontaminación

El proceso de descontaminación, cualquiera sea el agente que se emplee deberá ajustarse a rigurosas normas de control de calidad. Los descontaminantes más frecuentes y las pautas para su correcta utilización son:

6.2.1 Descontaminantes físicos

Vapor: el autoclavado de los materiales es el método de elección para todo material reusable.

Calor seco: este sistema es apropiado para elementos e instrumental que puedan resistir una temperatura de 180 °C quedando excluídos de este procedimiento algunos materiales plásticos.

Ebullición: Este es el método más simple y confiable para inactivar la mayoría de los agentes patógenos en caso de no disponer de un autoclave. Se consigue un buen nivel de desinfección de instrumentos y equipos cuando estos materiales se sumergen en agua a ebullición durante 20 a 30 min.

6.2.2 Descontaminantes químicos

Hipoclorito de sodio, agua lavandina, agua blanqueadora o agua de javel: Cuando se diluyen con agua, las soluciones de hipoclorito, generan ácido hipocloroso siendo este compuesto el verdadero principio activo de la acción biológica.

El ácido hipocloroso reacciona con casi cualquier molécula orgánica pero **en cada reacción individual desaparece una molécula de ácido hipocloroso**. Es decir, la solución **SE AGOTA** en su principio activo.

Esta situación hace necesario adecuar la relación entre agente descontaminante y material contaminado y establecer conductas para la renovación de las soluciones descontaminantes en el curso del día de trabajo en función de la **CALIDAD Y CANTIDAD** del material a tratar.

Las soluciones de hipoclorito deberán prepararse en el día y

no deberán usarse más allá de 24 horas de su preparación.

- solución al 0,5 g/100ml de cloro activo. Usar para superficies muy contaminadas (material de laboratorio). Dejar en contacto 30 a 60 min.
- solución al 0,1 g/100ml de cloro activo. Para limpieza de superficies poco contaminadas (paredes, pisos, etc).

Otros agentes liberadores de cloro activo

- Cloraminas.
- Hipoclorito de calcio.

Otros agentes químicos

a. **Alcoholes**: tanto el alcohol etílico como el isopropílico son descontaminantes muy efectivos usados en una concentración del 70%. El primero de ellos es adecuado para superficies tales como mesada de trabajo o el exterior de los recipientes contenedores de muestras; a su vez el alcohol isopropílico es útil para descontaminar distintos equipos de laboratorio, por ej. microscopios, lectores de ELISA, etc.

b. **Ioduro de polividona** (PVI): la actividad descontaminante es similar a la del hipoclorito de sodio, aunque es más caro y no se puede usar en superficies de aluminio o cobre.

c. **Formaldehído-formalina**: la formalina es un excelente descontaminante pero su uso está limitado debido a que sus soluciones liberan vapores tóxicos e irritantes.

d. **Glutaraldehído**: el glutaraldehído es un agente descontaminante de altísima eficacia, se usa frecuentemente para el tratamiento de materiales y equipos reusables que sean sensibles al calor y al tratamiento con otros agentes químicos.

6.2.3 Manejo y eliminación de material contaminado y de desechos

a. Todo el equipo reusable (tips para micropipetas, tubos para recolección de especímenes, etc.) deberá ubicarse en un recipiente metálico o de plástico, resistente a punciones o cortaduras, conteniendo líquido descontaminante y deberá estar ubicado en el mismo lugar de trabajo.

b. Los camisolines, chaquetas u otra prenda protectora que se use en el laboratorio deberá colocarse al finalizar la tarea dentro de un recipiente a prueba de pérdidas el que será transportado de manera segura al lugar adecuado para proceder a la desconta-

minación y posterior preparación de las prendas para su reuso.

c. Todo elemento descartable (agujas, jeringas, etc) deberá colocarse en un recipiente de material resistente a punciones o cortaduras, similar al descripto en **a.** el que será colocado dentro de un recipiente a prueba de pérdidas para ser descontaminado e incinerado, siempre que esto sea posible.

d. El método de elección para la eliminación de todo material contaminado es la incineración. Si el incinerador no está ubicado en el predio del laboratorio y bajo el control del mismo este material será autoclavado y luego destruido.

6.3 Conducta ante accidentes

- **Derrames**

Cuando se produzca derrame de material potencialmente infectado, el operador deberá ponerse guantes y luego cubrir el fluido derramado con papel absorbente, derramar alrededor de este material solución descontaminante y finalmente verter solución descontaminante sobre el papel y dejar actuar por lo menos 20 min.

Usando papel absorbente, seco y limpio, levantar el material y arrojarlo al recipiente de desechos contaminados para su posterior eliminación.

La superficie deberá enjuagarse nuevamente con solución descontaminante. Los guantes serán descartados después del procedimiento. No se recomienda el uso de alcohol ya que este se evapora rápidamente y además coagula los residuos orgánicos superficiales sin penetrar en ellos.

- **Pinchazos o lastimaduras**

Los pinchazos, heridas punzantes, lastimaduras y piel contaminada por salpicadura de materiales infectados deberán lavarse con abundante agua y jabón. Deberá favorecerse el sangrado de la herida.

- **Aerosoles**

En el caso de que el accidente genere aerosoles (ej. rotura de centrífuga u homogeneizador), el trabajador deberá contener la respiración, abandonar inmediatamente el cuarto cerrando la puerta y avisar de inmediato a su supervisor.

El sistema de aire y las cabinas de seguridad biológica serán dejadas en ventilación. Personal idóneo, usando ropas apropiadas, podrá entrar al cuarto después de 30 min. de ocurrido el accidente para efectuar las tareas de descontaminación.

Todo accidente o exposición a materiales potencialmente infecciosos deberán comunicarse inmediatamente al personal responsable.

6.4 Manejo y transporte de materiales biológicos

El manejo y transporte de muestras de manera inadecuada significa riesgo de infección.

El manejo impropio de las muestras dentro del laboratorio pone en peligro no sólo al trabajador del laboratorio sino también al personal administrativo y de apoyo.

La transferencia de muestras entre laboratorios o instituciones amplía el margen de riesgo. Los lineamientos a seguir en este caso serán:

a. Los tubos, frascos, etc. para muestras deberán ubicarse en gradillas para que estén siempre en posición vertical. Las gradillas se ubicarán en un recipiente hermético para prevenir salpicaduras o diseminación del material por rotura de los tubos.

b. Los recipientes para transportar materiales deberán ser herméticos, construidos con material resistente a roturas y contar con tapa de seguridad.

TECNICA:.....

LOTE Nro.:..... FECHA DE VENCIMIENTO:.....

FECHA DE REALIZACION:..... OPERADOR:.....

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

MEDIA DE CONTROLES NEGATIVOS:..... MEDIA DE CONTROLES POSITIVOS:..... CUT OFF:.....

PLANILLA PARA VOLCAR LOS DATOS DE LAS PRUEBAS DE ELISA O AGLUTINACION

TECNICA: ELISA

LOTE Nro.: 9406205 FECHA DE VENCIMIENTO: 28-02-95

FECHA DE REALIZACION: 13-01-95 OPERADOR: M. Pippo

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	521 0.137	522 2.288	523 0.128	524 0.117	525 0.121	526 0.114	527 0.124	528 0.398	529 0.204	530 0.356	531 1.343	532 2.576
B	533 0.102	534 0.115	535 0.104	536 0.177	537 1.567	538 0.788	539 1.169	CONT. NEG. 0.127	CONT. NEG. 0.172	CONT. NEG 0.135	CONT. POS. HIV-1 1.836	CONT. POS HIV-2 0.726
C												
D												
E												
F												
G												
H												

Código de la muestra

Valor de la densidad óptica

MEDIA DE CONTROLES NEGATIVOS: 0.144 MEDIA DE CONTROLES POSITIVOS: - CUT OFF: 0.244

EQUIPO:.....

LOTE Nro.:..... FECHA DE VENCIMIENTO:.....

FECHA DE REALIZACION:..... OPERADOR:.....

	CODIGO		160	120	65	55	51	41	31	24	17				RESULT.	OBSERVACIONES
1																
2																
3																
4																
5																
6																
7																
8																
9																
10																
11																
12																
13																
14																
15																
16																
17																
18																

PLANILLA PARA VOLCAR LOS DATOS DE LA PRUEBA DE WESTERN BLOT.

EQUIPO: HIV 1/2 W.B.

LOTE Nro.: NE 707 832 FECHA DE VENCIMIENTO: 28-06-95

FECHA DE REALIZACION: 13-2-95 OPERADOR: M. Pinto

	CODIGO		160	120	65	55	51	41	31	24	17	C.I	36		RESULT.	OBSERVACIONES
1	6237	1	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–		NEG.	
2	6240	2	+	+	+	–	–	+	+	+	+	+	–		POS.	
3	6245	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–		POS.	
4	6246		+	+	–	–	–	+	+	+	–	+	–		POS.	
5	6248	5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	–		POS.	
6	6251	6	+	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–		IND.	
7	6253	7	–	–	–	–	–	–	–	+	–	+	–		IND.	
8	CONT. NEG.	8	–	–	–	–	–	–	–	–	–	+	–			OK
9	CONT. POS. DEB.	9	+	+	–	–	–	+	–	+	–	+	–			OK
10	CONT. POS. FUERTE	10	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			OK
11		gp160 p65 p51 p31 p24 Control interno														
12		gp120 p55 gp41 p17 gp36 (HIV-2)														
13																
14		+ Indica la presencia de la banda														
15		– Indica la ausencia de la banda														
16																
17																
18																

GLOSARIO

ALGORITMO: Son las etapas sucesivas que deben seguirse en el procedimiento diagnóstico.

CONTROL DE CALIDAD: Son todos los procedimientos que deben incluirse en un ensayo diagnóstico para verificar que se efectuó correctamente.

DIAGNOSTICO DE INFECCION POR VIH: Procedimientos técnicos que, empleando reactivos específicos, permiten establecer si un individuo está infectado por VIH. Bajo ningún concepto estos procedimientos por si solos establecen el diagnóstico de SIDA.

GUIA DE PROCEDIMIENTO: Descripción escrita y sumaria de los distintos procedimientos y técnicas utilizadas en el laboratorio.

INDETERMINADO: Resultado de la serología que no permite establecer si el individuo en estudio está o no infectado por VIH.

INFECCION POR VIH: Estado, con o sin síntomas, que implica una exposición y contacto con el virus el cual invade el organismo y se establece en células susceptibles. Este estado se diagnostica por técnicas de laboratorio.

PANELES DE REFERENCIA: Conjunto de sueros utilizados para evaluar pruebas serológicas.

PERIODO DE VENTANA: Tiempo que transcurre desde el momento de la infección hasta la aparición de los anticuerpos circulantes (2 a 8 semanas).

PREVALENCIA: Número de individuos infectados -en un momento dado- en el total de la población estudiada.

PROGRAMA DE GARANTIA DE CALIDAD: Es el programa que asegura que el resultado final emitido por el laboratorio es correcto. Debe necesariamente considerar las tres etapas del procesamiento de una muestra (pre- analítica, analítica y post-analítica).

PRUEBAS O ENSAYOS DE CONFIRMACION O SUPLEMENTARIAS: Son técnicas serológicas altamente específicas que se utilizan para confirmar los resultados de las pruebas de tamizaje.

PRUEBAS O ENSAYOS DE TAMIZAJE: Son aquellas técnicas seroló-

gicas que permiten la detección de anticuerpos con el mayor nivel de sensibilidad posible.

REPRODUCIBILIDAD: Posibilidad de repetir los resultados de una prueba diagnóstica en distintos momentos o en diferentes laboratorios.

SEROCONVERSION: Desarrollo de anticuerpos específicos luego del contacto con un agente infeccioso o depués de una vacunación.

SIDA: Síndrome de inmunodeficiencia adquirida. Es una entidad clínica que forma parte de estadios avanzados de la infección por el VIH.

VALORACION EXTERNA DE CALIDAD: Es una evaluación del desempeño del laboratorio realizada por un laboratorio de referencia. Constituye una forma de probar la efectividad de los programas de garantía de calidad.

VALOR PREDICTIVO NEGATIVO: Es la probabilidad que tiene un individuo de no tener la infección que detecta la prueba cuando el resultado es negativo.

VALOR PREDICTIVO POSITIVO: Es la probabilidad que tiene un individuo de estar infectado cuando el resultado de la prueba es positivo.

VIH: Virus de la inmunodeficiencia humana. Retrovirus humano que infecta principalmente células del sistema inmunológico (linfocitos) provocando deficiencias inmunológicas que llevan al desarrollo de infecciones oportunistas y otras alteraciones (SIDA).

BIBLIOGRAFIA

- Ruiz, A. Seguridad y bioseguridad en laboratorios biológicos. Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana. Supl. No. 4:15-22, 1988.

- Guidelines for Organizing National External Quality Assessment Schemes for HIV Serological testing. Global Programme on AIDS, WHO. GPA/RES/DIA/91.2. 1991.

- Cura E, de Titto E.H, Segura E.L. Control de Calidad del Inmunodiagnóstico de la Enfermedad de Chagas. Manual de Procedimientos. Ministerio de Salud y Acción Social de la República Argentina, OPS, Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas» Dr. Mario Fatala Chaben». 1992

- Constantine N.T., Callahan J. and Watts D. Retroviral Testing. Essentials for Quality Control and Laboratory Diagnosis. CRC Press. 1992.

- Normas de bioseguridad para laboratorios de diagnóstico e investigación que trabajan con el VIH. Serie OMS sobre el SIDA, Nº 9. Organización Mundial de la Salud. 1992.

- Recomendaciones para la Elección y el Uso de Pruebas de Detección de Anticuerpos contra el VIH. OMS, Programa mundial sobre SIDA. WHO Weekly Epidemiological Record. No. 20 Pag. 145-149.1992

- Cura E y Wendel S. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología y de los Bancos de Sangre. PAHO/HPC/HCT/94.21. 1994.

- Schochteman G. and George J.R. Aids Testing. A comprehensive guide to technical, medical, social, legal and management issues. Second Edition Springer Verlag 1994.

NOTAS

NOTAS

NOTAS

Este libro se terminó de imprimir en el mes de abril de 1995, en los Talleres Gráficos Segunda Edición, Gral Fructuoso Rivera 1066, Capital Federal