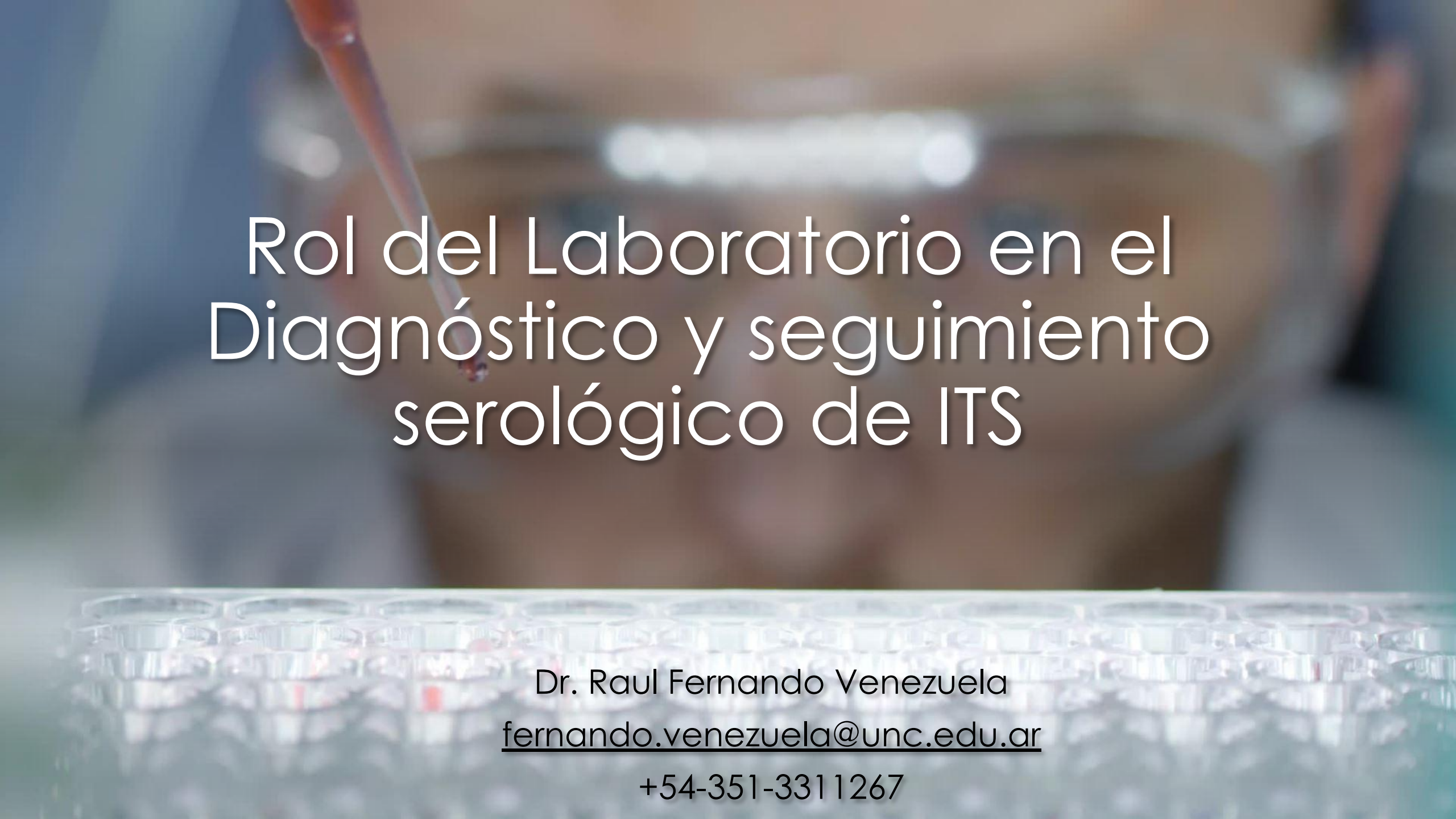


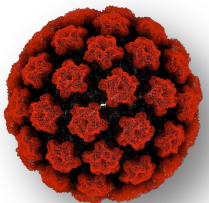


Rol del Laboratorio en el Diagnóstico y seguimiento serológico de ITS

Dr. Raul Fernando Venezuela
fernando.venezuela@unc.edu.ar

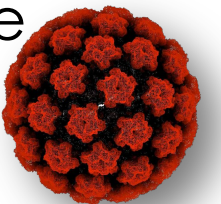
+54-351-3311267

- Las ITS son un importante problema de salud pública en Argentina, con un aumento sostenido en los últimos años, principalmente entre jóvenes y adultos jóvenes.
- Las prácticas sexuales sin protección son la principal vía de transmisión (>95% para VIH y sífilis).
- El diagnóstico de estas infecciones es fundamental para la salud pública y los laboratorios debemos garantizar la confiabilidad de nuestros resultados.



Algunos Datos

- Aproximadamente 140.000 personas viven con VIH en Argentina;
- 13% desconoce su estatus.
- Unos 6.400 nuevos casos por año.
- 98% de los casos se transmiten por relaciones sexuales sin protección.
- Un 45% de los diagnósticos se realiza en forma tardía.
- **Sífilis** es la ITS de mayor crecimiento en Argentina: de 10.590 casos (2020) a 32.293 casos (2023).
- Prevalencia de portadores crónicos (**HBsAg**): 0,17% a 0,21% en población general.
- Grupos más afectados: adultos jóvenes no vacunados
- Prevalencia **Hep. C** estimada en adultos: 1,0 a 1,5%.
- Adultos mayores de 40 años y en poblaciones con antecedentes de transfusión, uso de drogas inyectables o hemodiálisis.



- **Capítulo IV: Diagnóstico**

- Artículo 14.- Carácter de la prueba diagnóstica.

Toda prueba deberá ser:

- a) Voluntaria, sólo puede efectuarse con el consentimiento de la persona;
- b) Gratuita en todos los subsistemas de salud;
- c) Confidencial, tanto la prueba como el resultado de la misma;
- d) Universal, para toda persona que la solicite;
- e) Realizada con el debido asesoramiento y participación previa y posterior al testeo, en un marco que garantice la vinculación de la persona con los sistemas de salud.

Asimismo, se deberá garantizar el acceso universal y gratuito a todas las pruebas de detección de otras infecciones de transmisión sexual.

Programas de formación de personal

- Introducción a buenas prácticas de laboratorio;
- Comunicación eficaz y al servicio del paciente;
- Revisión de formatos para el registro de información;
- Capacitación en la realización de las técnicas
 - fases del proceso, obtención de muestra hasta la lectura, interpretación, registro y la notificación de resultados,
- Experiencia directa en el cual todos los participantes tomen muestras y realicen técnicas;
- Procedimientos de seguridad frente a riesgos biológicos,
- Importancia de los elementos esenciales del sistema de calidad;

Las instrucciones de trabajo deberán trazar la secuencia de trabajo y deberán incluir toda la información necesaria correspondiente a las fases preanalítica, analítica y postanalítica, respectivamente.

Fase preanalítica

Verificación cotidiana de la temperatura ambiental y en el lugar de almacenamiento.

Verificación, del inventario y de los lotes de los kits a utilizar.

Verificar el funcionamiento del instrumental

Recepción de solicitudes de análisis/Consentimiento.

Verificación de la identidad de la persona

Cerciorarse de que haya recibido el asesoramiento pre test

Correcta rotulación

Extracción de calidad (interferentes)

Conservación de la muestra hasta su proceso

Organización física del lugar donde se realizan las pruebas de diagnóstico.

Registro de toda la información necesaria, como el número de lote del kit y quien realizará la técnica.

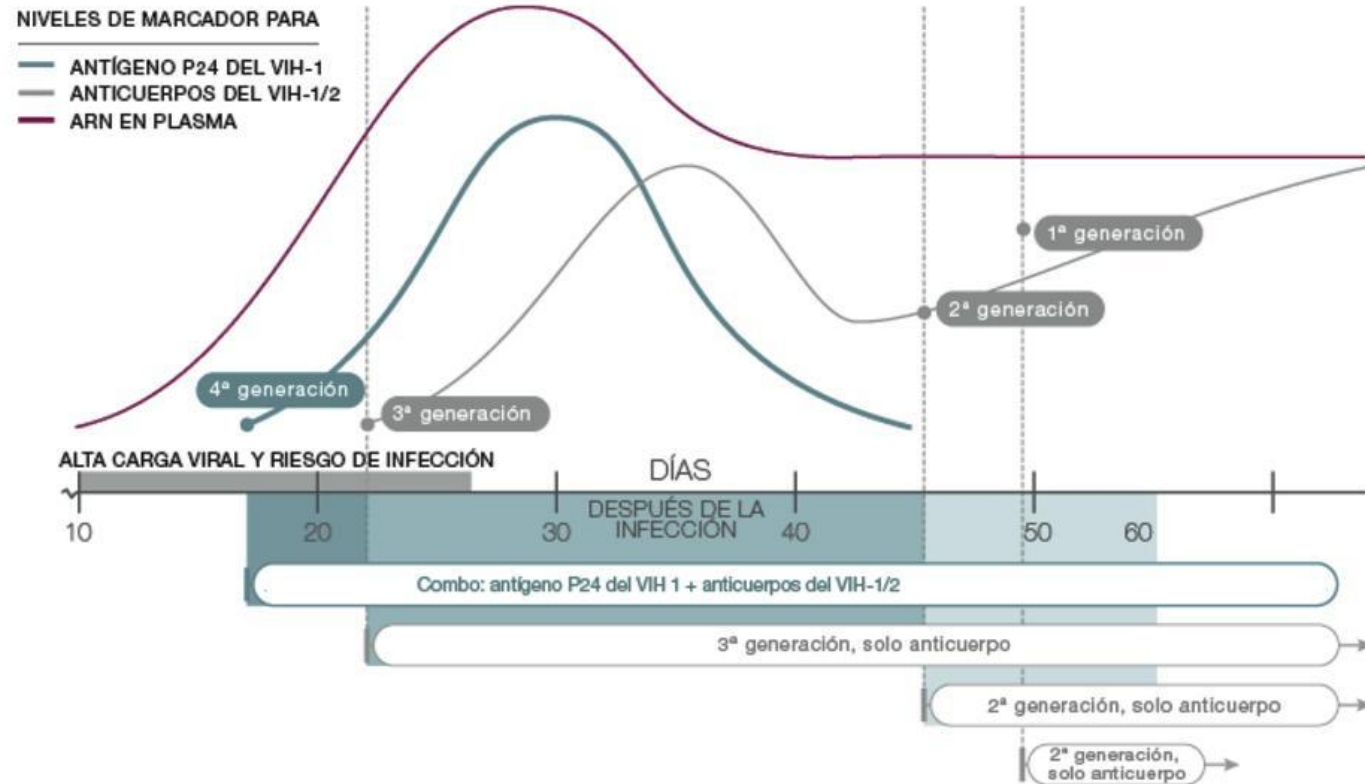
Fase analítica

1. Precauciones en materia de seguridad frente a riesgos biológicos.
2. Control de calidad conforme a las instrucciones del Procedimiento Operativo Estandarizados.
3. Realización de la prueba de acuerdo a las instrucciones del fabricante del kit.
4. Interpretación de los resultados.

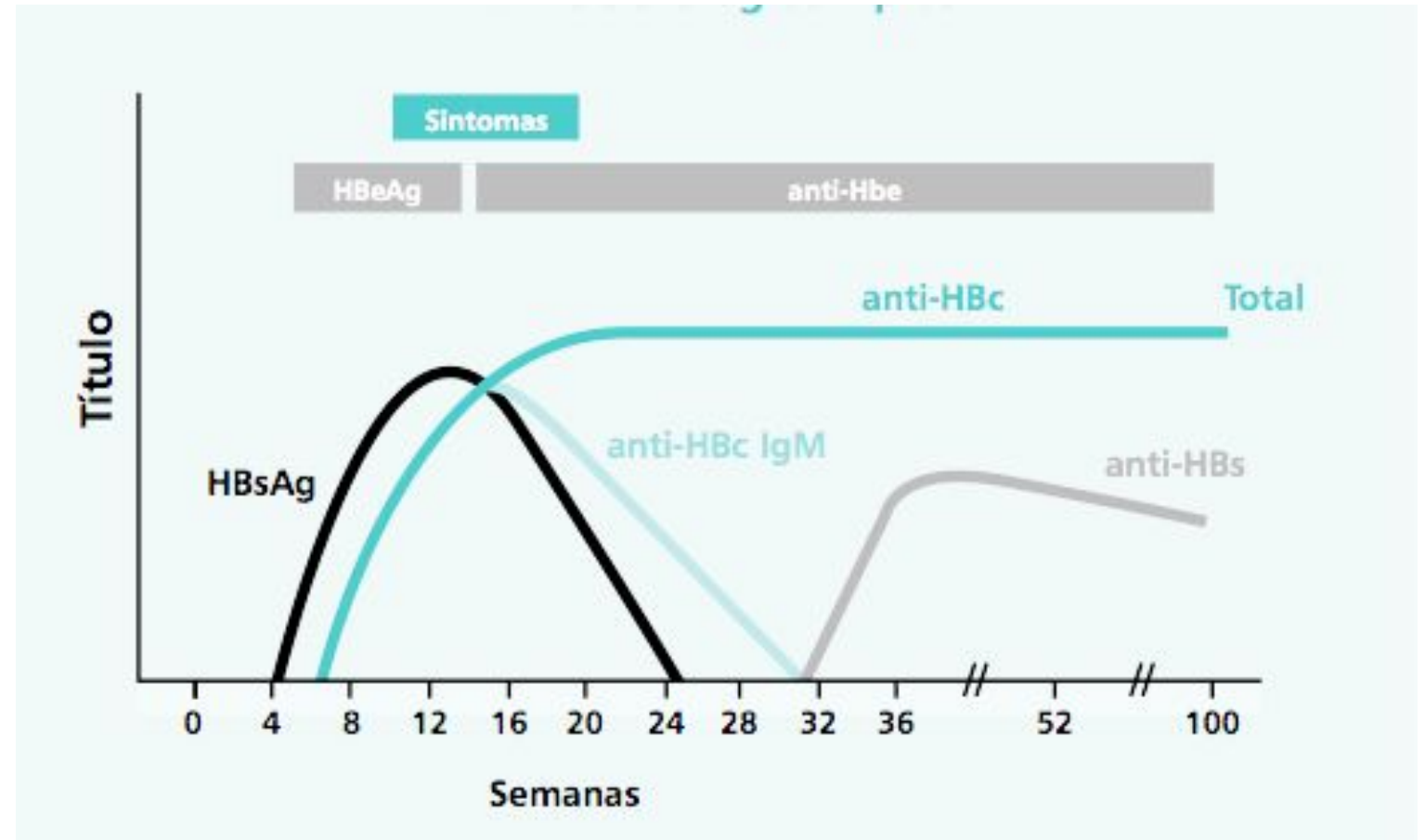
Fase postanalítica

1. Nueva verificación de los datos de identificación del paciente y notificación de los resultados.
2. Limpieza y eliminación de desechos que conlleven riesgo biológico.
3. Embalaje y transporte de las muestras destinadas a nuevas pruebas de verificación por parte del laboratorio de referencia o almacenamiento adecuado de éstas hasta el siguiente envío al laboratorio, según corresponda.

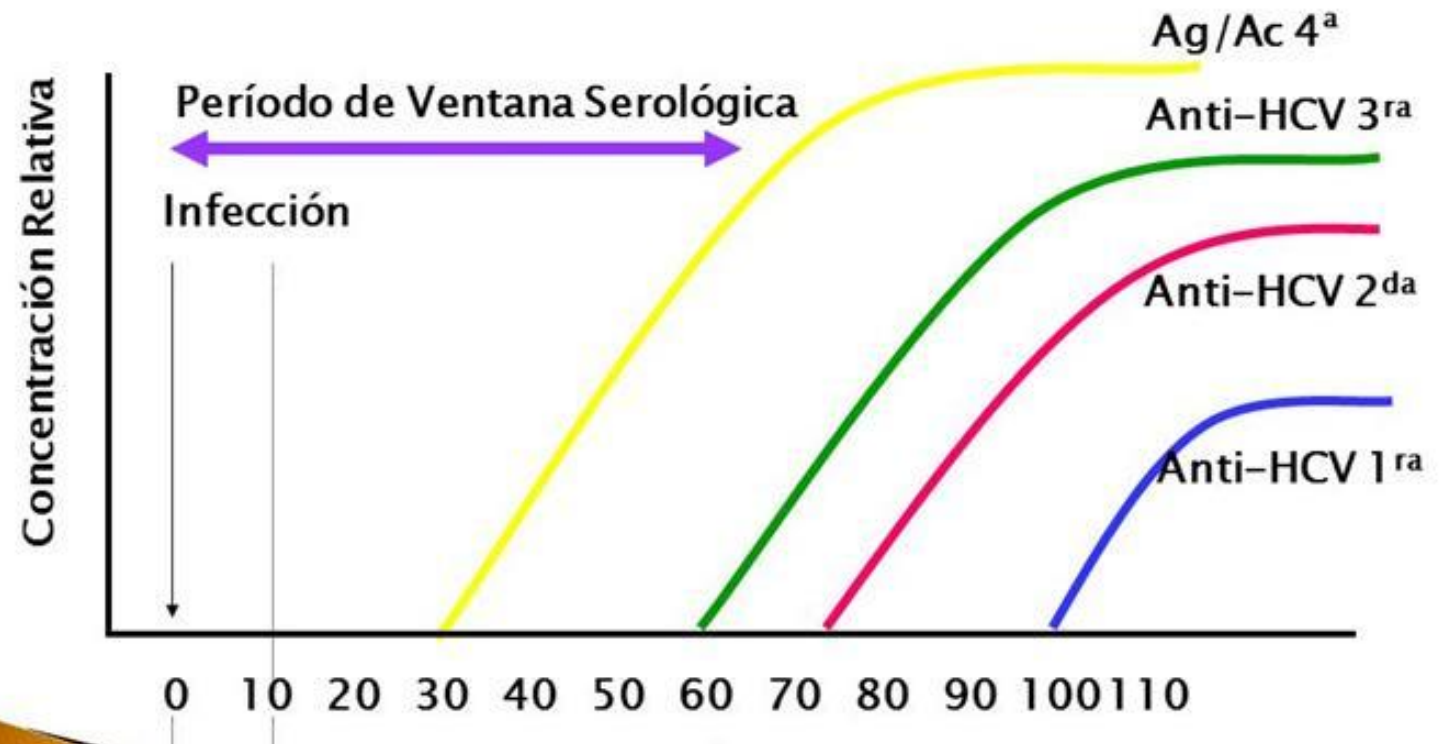
Período de ventana



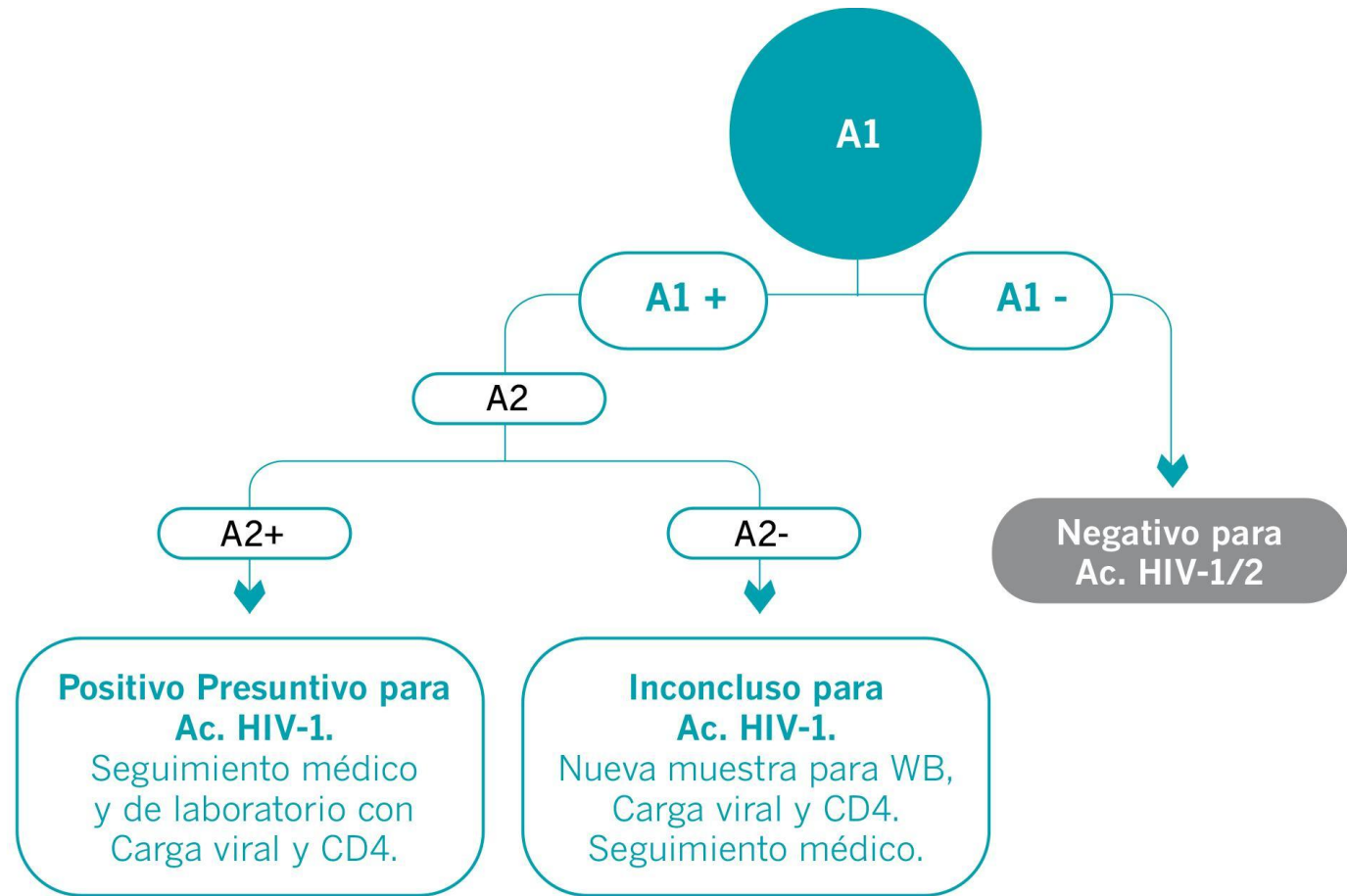
Período de
ventana



Período de
ventana



Algoritmo diagnóstico

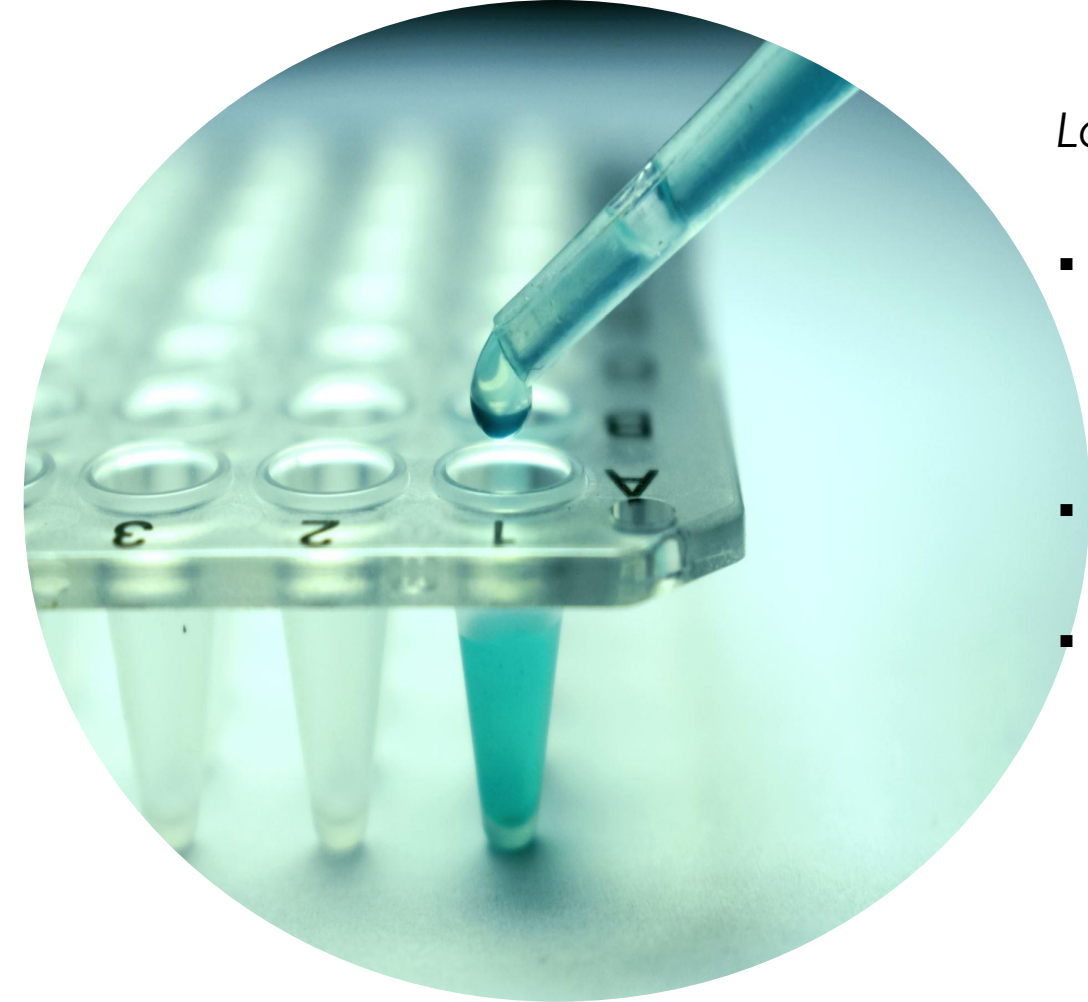


A1 EIA de 4ta Generación. **A2** EIA de 4ta Generación de distinto formato o test rápido



control interno

- En ciertos kits el control es algún material suministrado como control de valor negativo o positivo conocido de VIH.
- Además de estos controles incorporados en los kits es muy importante emplear muestras para control interno con cada serie de pruebas
- El CI tiene por objetivo identificar variaciones de lote a lote y detectar errores aleatorios o sistemáticos.
- El CI, se debe procesar de rutina en cada ensayo y debe ser tratado como una muestra de paciente.
- No debe descongelarse ni utilizar las alícuotas mas de una vez,
 - Puede ocasionar disminución de los analitos presentes en la muestra y como consecuencia alterar el patrón de reactividad



La selección de las muestras, preparación, almacenamiento y uso de CI requiere de procesos específicos.

- Las muestras para la preparación del CI, deben presentar de 1.5 a 4.5 veces arriba del valor del punto de corte (zona de reactividad, que permite la detección de errores durante la realización de las pruebas)
- El diluyente a utilizar en la preparación del CI, debe ser de preferencia suero negativo
- Cada laboratorio debe preparar su CI, ya que las condiciones de cada institución son diferentes

- El resultado obtenido del CI debe expresarse en forma grafica (grafico de Levey-Jenning), estableciendo el limite inferior, medio y superior.
- Si los puntos del control de calidad, están dentro de los limites de variación aceptables, la «corrida» es valida.

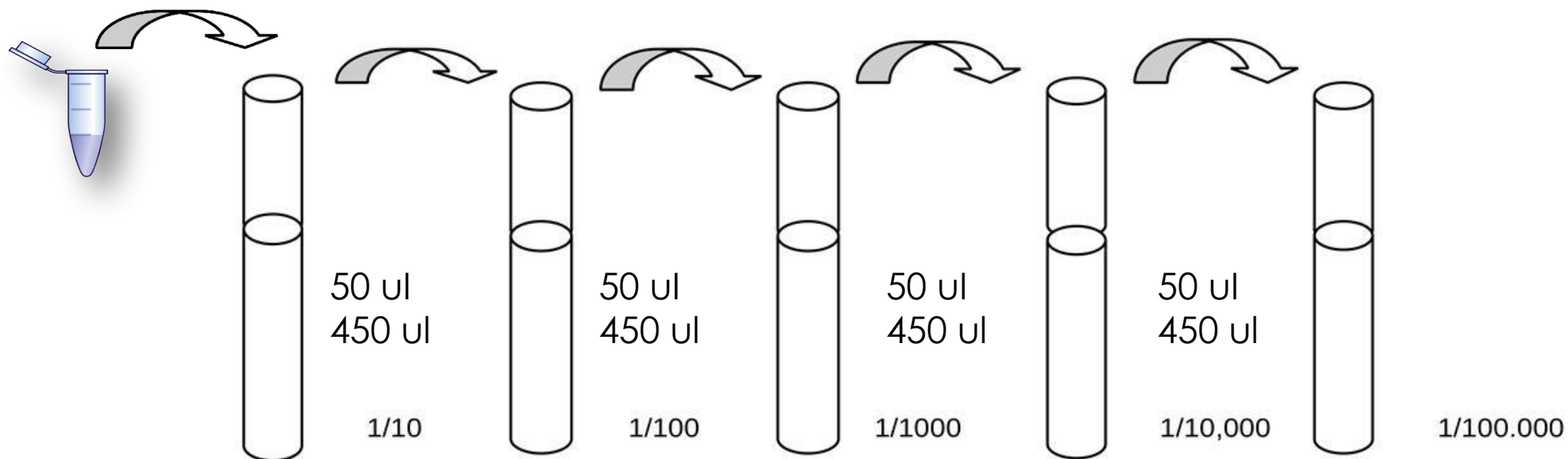


Preparación de diluciones de la muestra positiva para obtener la reactividad ideal.

- Diluciones de la muestra positiva en razón de 1 en 10
- Trabajar con un volumen mayor de 20 microlitros de la muestra positiva para evitar la posibilidad de error.
- El valor ideal de la reactividad se debe definir tomando en cuenta el valor de corte del inserto (corte 0,35 rango: 0,53 y 1,6)
- Probar cada una de las diluciones con el reactivo en uso para el cual está preparando su CI.

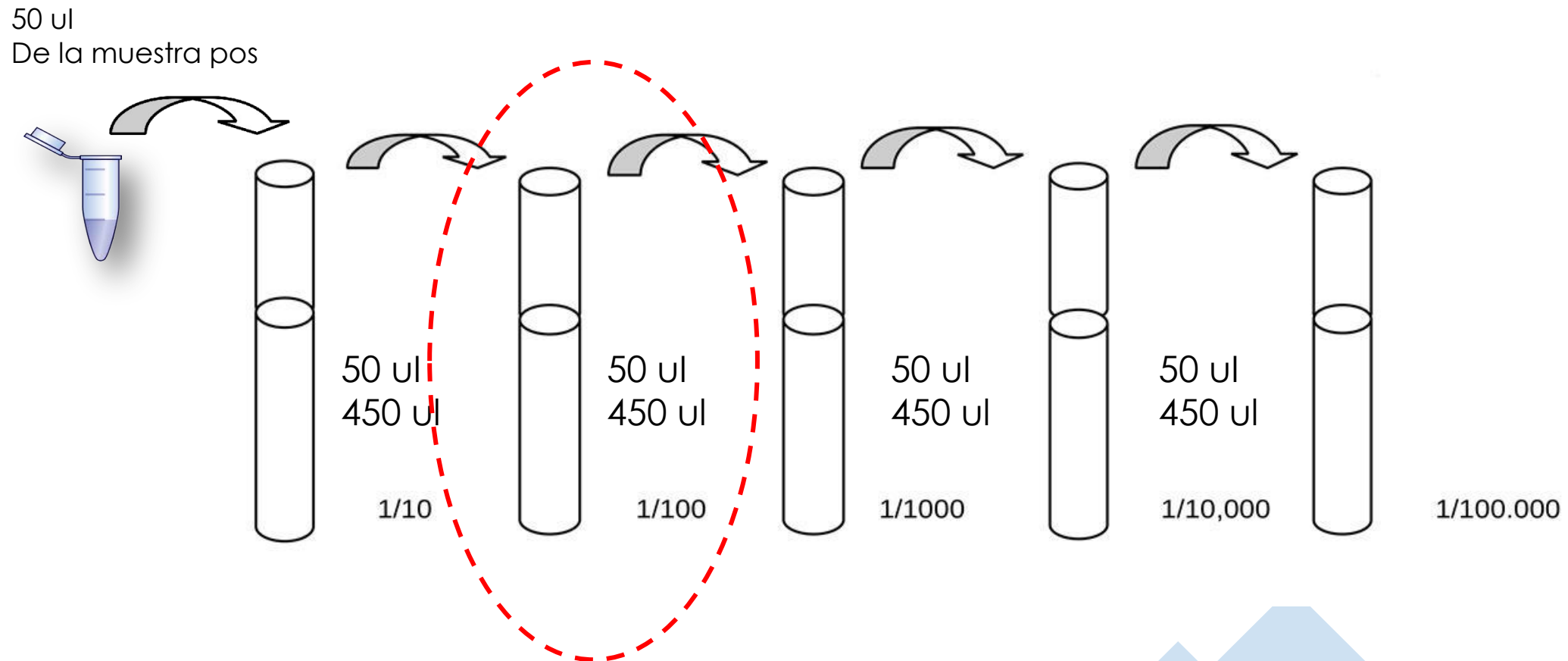
50 µl

De la muestra pos

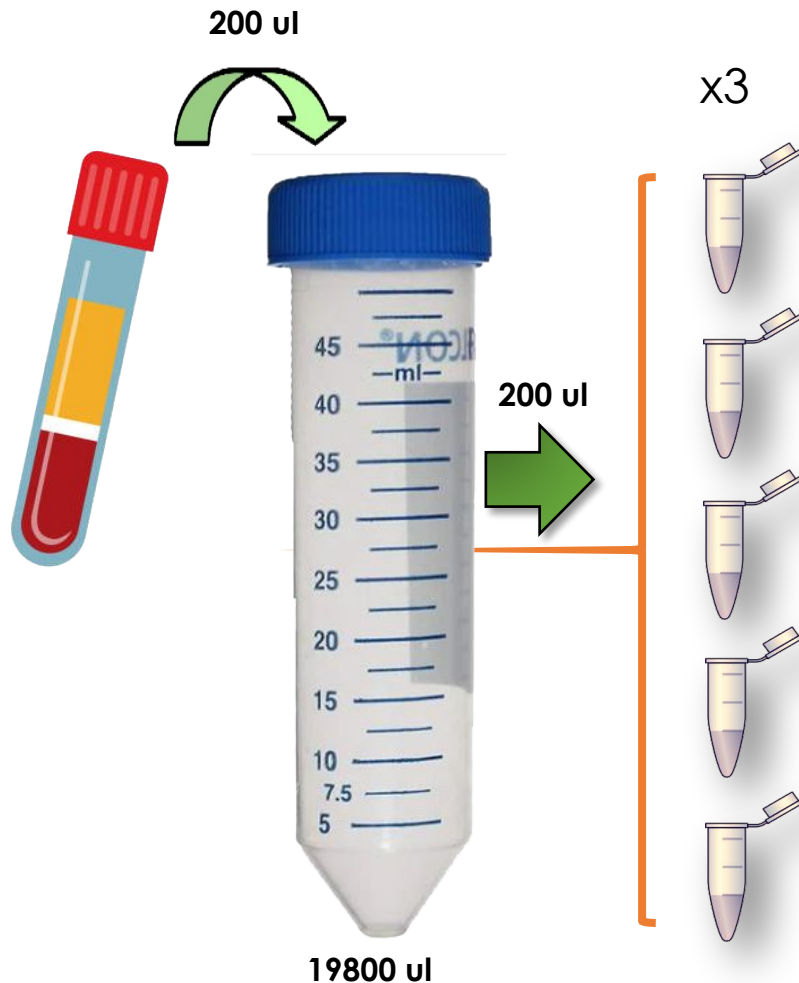


Analizar los resultados obtenidos considerando las siguientes posibilidades:

- El valor ideal buscado está en una de las diluciones.
- El valor ideal buscado no fue encontrado en ninguna de las diluciones.
- El valor ideal buscado está entre 2 diluciones.
- Corte 0,35 (0,53 y 1,6)

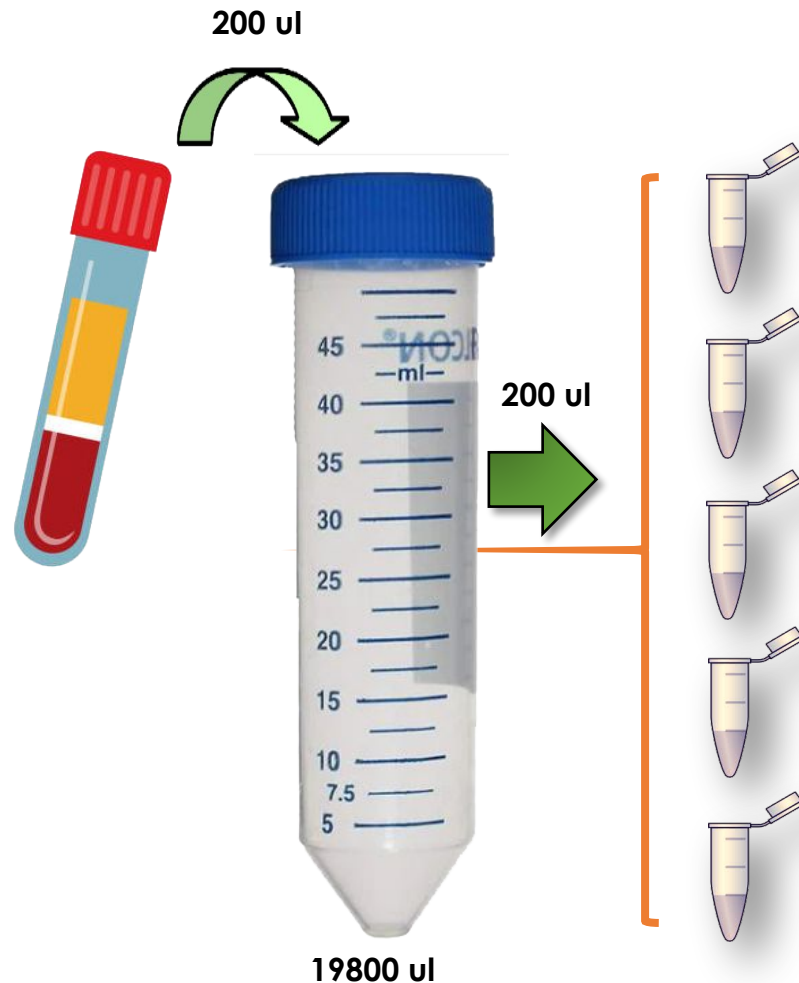


Validación del CI.



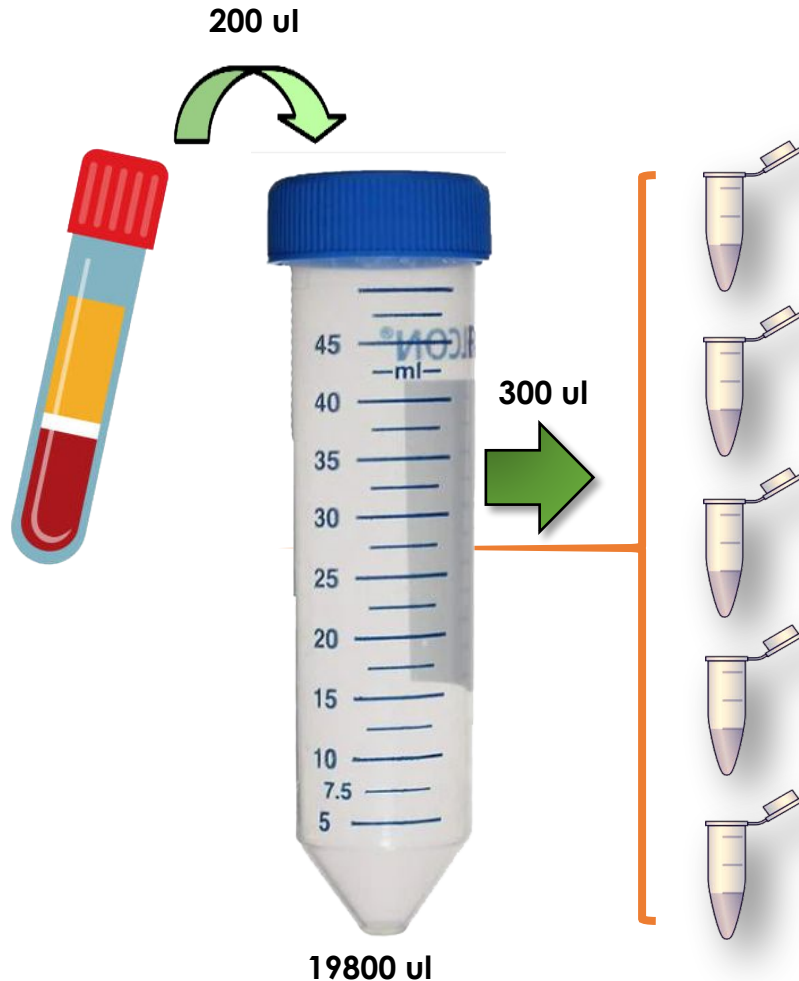
- Probar las alícuotas en tres ensayos: 5 alícuotas por cada ensayo
- Realizar los ensayos en días diferentes pero en forma continuada, por un tiempo no mayor a las 72 horas.
- Anotar los resultados de DO y valor de corte.
- Si los valores de DO obtenidos están dentro del rango se valida el ensayo

Validación del CI.



- Si cualquiera de los resultados se encuentra fuera de la zona recomendada (0,53 y 1,6), el **control no es válido**.
 - En este caso se debe homogeneizar el CI, separar 5 nuevas alícuotas y repetir el ensayo.
- Si en la repetición, cualquiera de los resultados estuviese nuevamente fuera del patrón establecido, **descartar este CI y preparar uno nuevo**.
- Si los 5 valores de la densidad óptica de las alícuotas están dentro de los valores recomendados, **el ensayo es validado**

DISTRIBUCIÓN EN ALÍCUOTAS Y ALMACENAMIENTO DEL CI.

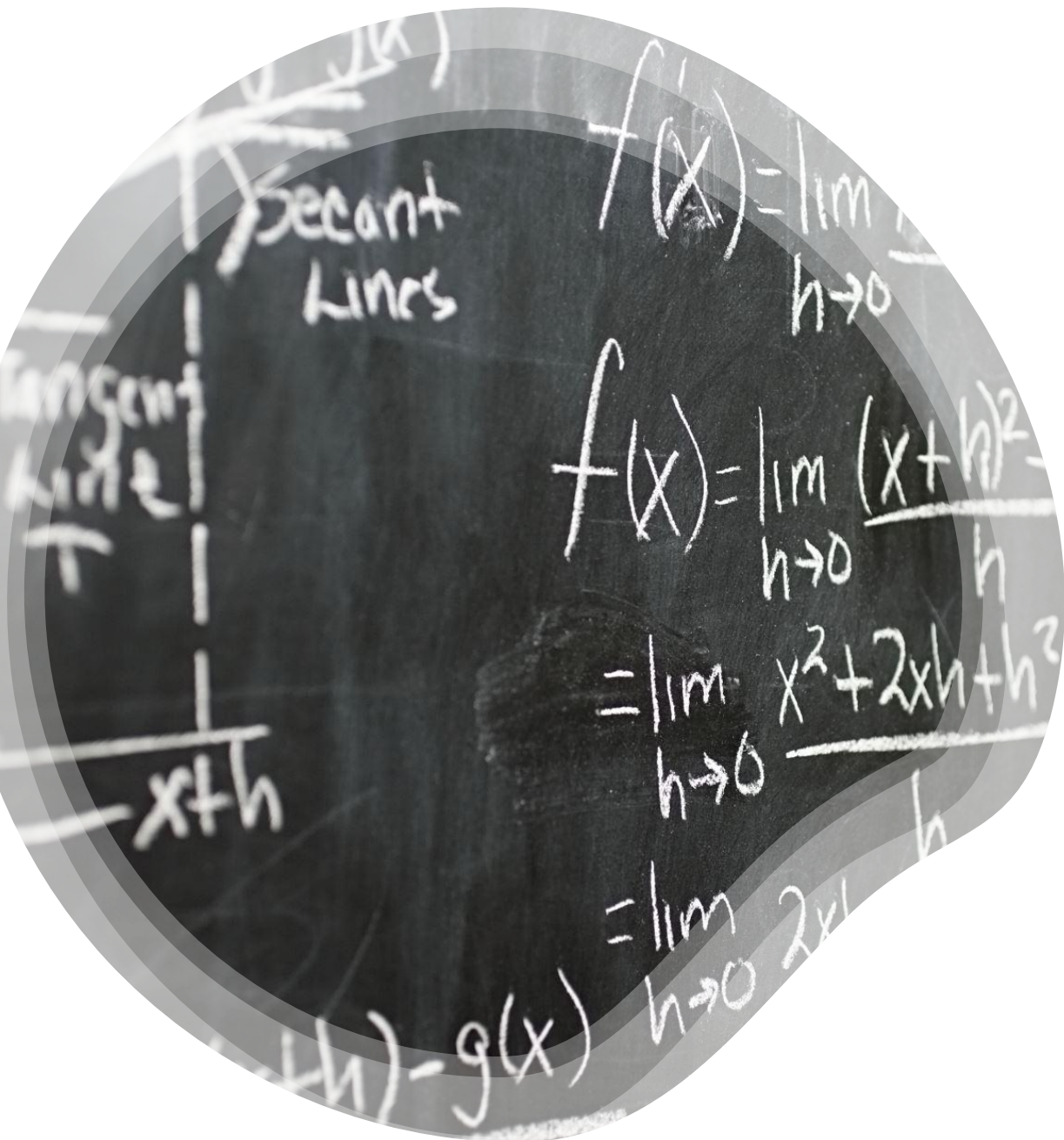


- **Rotular los viales con la información de prueba :**
 - a) Nombre de la prueba validada.
 - b) Número de lote
 - c) Fecha de preparación
- **Homogeneizar el CI y distribuir en los viales.**
- **Almacenar en una caja de plástico resistente a la congelación y conservar a -20°C mínimo.**

VALIDACIÓN DE LOS ENSAYOS CON EL RESULTADO DEL CONTROL INTERNO POSITIVO

- ❖ Calcular la razón DO/CORTE, para cada una de las 15 alícuotas obtenidas en la validación.
- ❖ Calcular la media geométrica y la SD.
- ❖ Establecer los límites superior e inferior (1s, 2s y 3s)
- ❖ Elaborar un gráfico Levey-Jennings, se construye considerando los límites de control $X \pm 1DS$, $X \pm 2DS$ y $X \pm 3 DS$.
- ❖ Ubicar en el gráfico los valores DO/CO del control de calidad interno, obtenidos en las corrida





Criterios para validar los resultados de un ensayo:

- Los calibradores y controles de los reactivos de kit deben cumplir con los criterios de validación del ensayo establecidos en el inserto.
- El control interno debe encontrarse en los límites de desviación establecidos.
- Para la toma de decisiones frente a los desvíos de los valores con respecto a la Media establecida deben aplicarse las Reglas de Westgard.

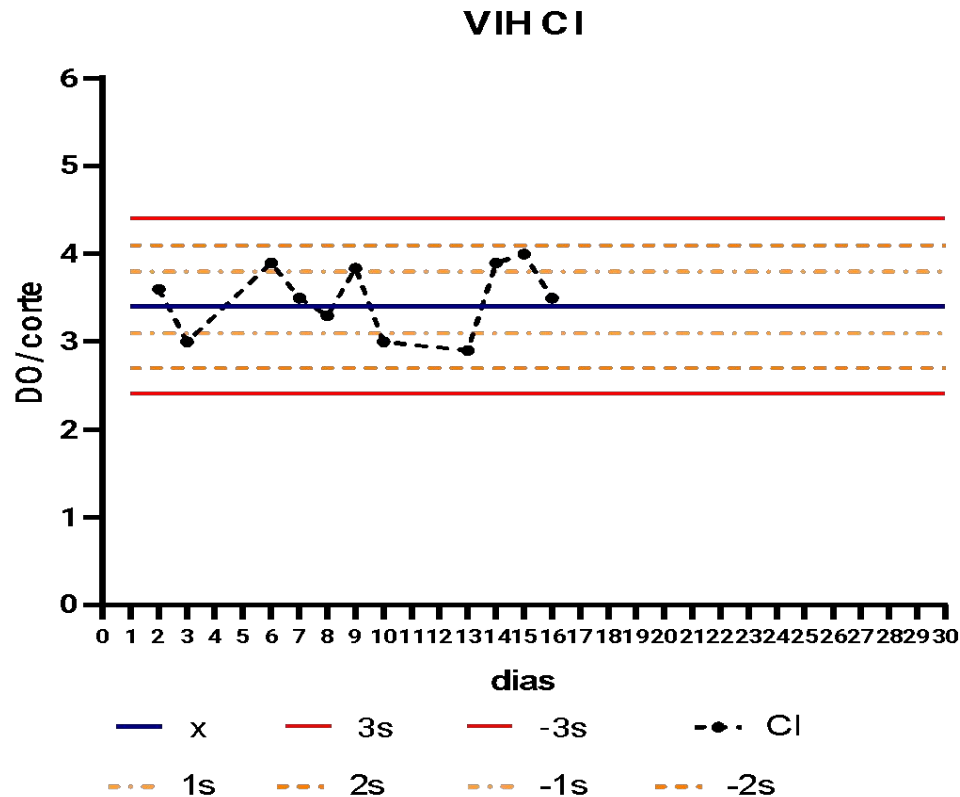


Reglas de Westgard

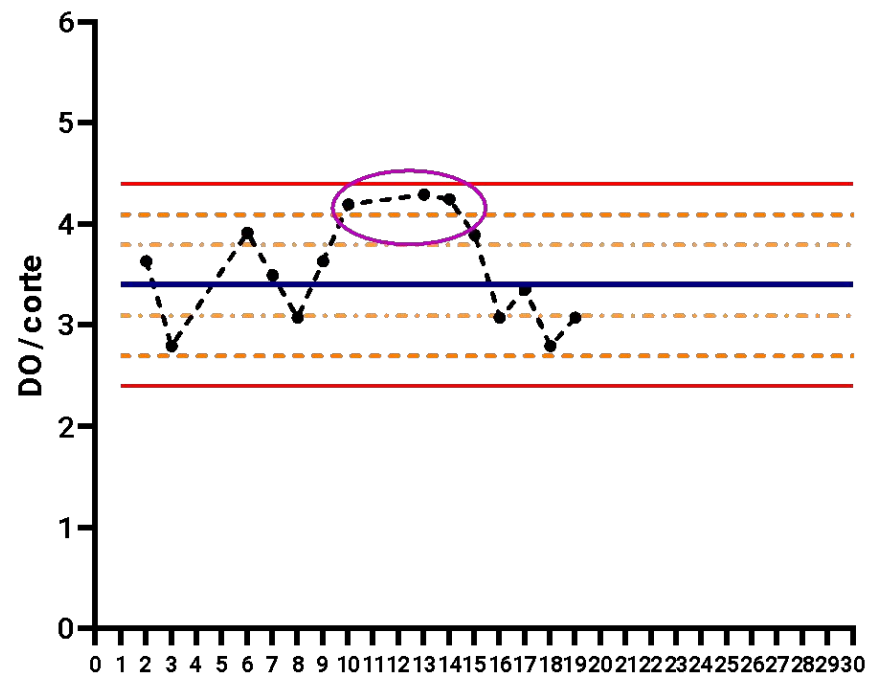
Evalúan la calidad de las corridas analíticas, permiten detectar variaciones en el desempeño alrededor de la media e identifican tipos de errores sistemáticos y aleatorios y apoyan a tomar la decisión de aceptar o rechazar todo el ensayo.

Consta las siguientes reglas básicas que se usan individualmente o en combinación

- R1 2Ds
- R1 3Ds
- R 4Ds
- R 22Ds
- R4 1Ds
- 10 x.



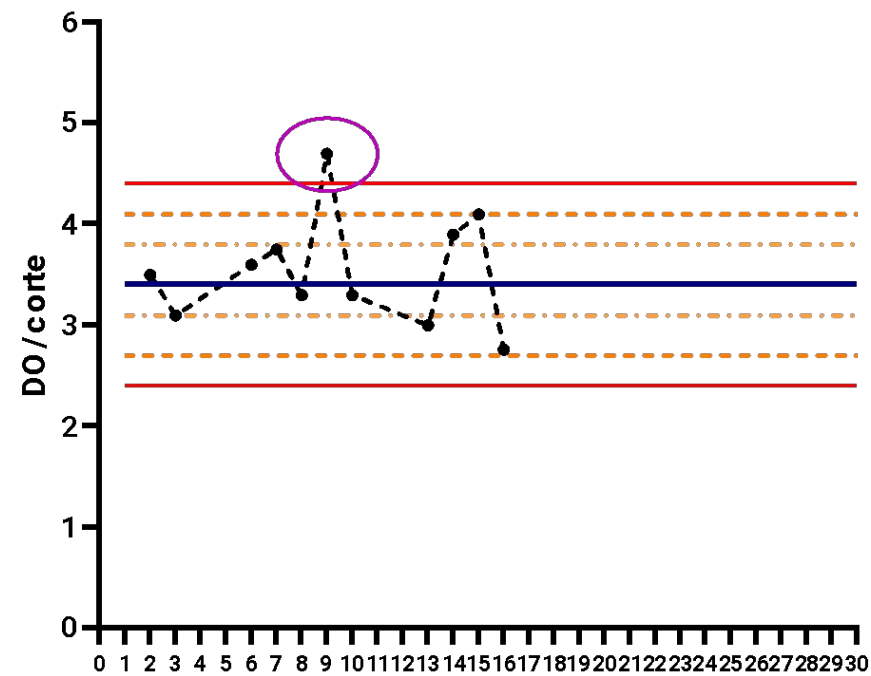
VIH CI



x 3s -3s CI
 1s 2s -1s -2s

R1 2Ds

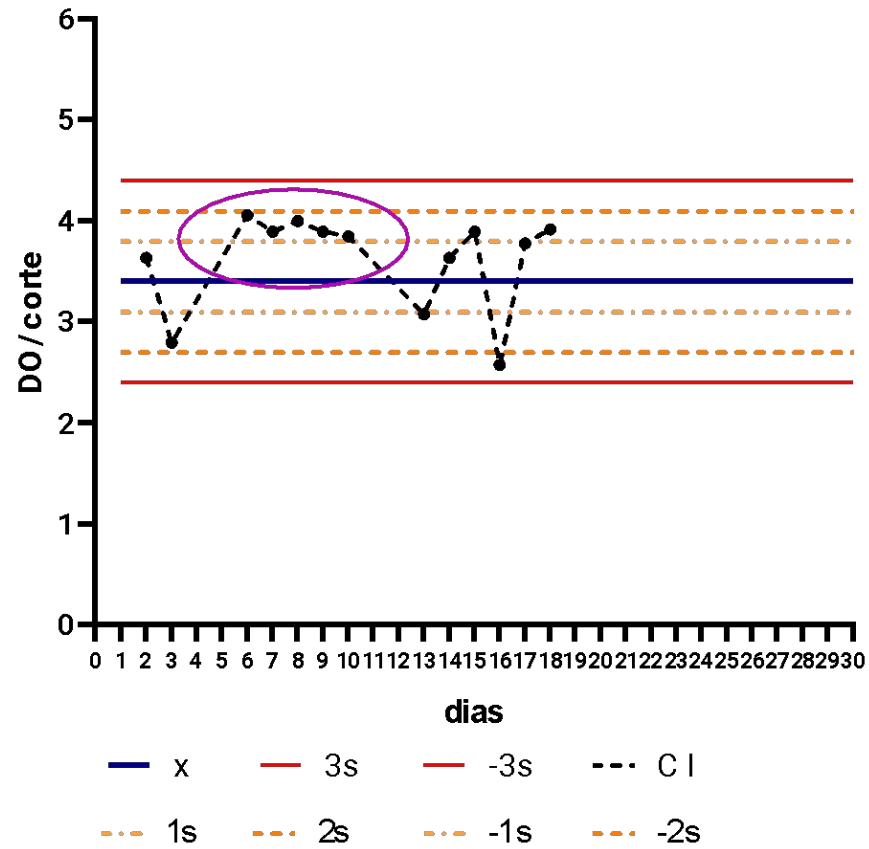
VIH CI



x 3s -3s CI
 1s 2s -1s -2s

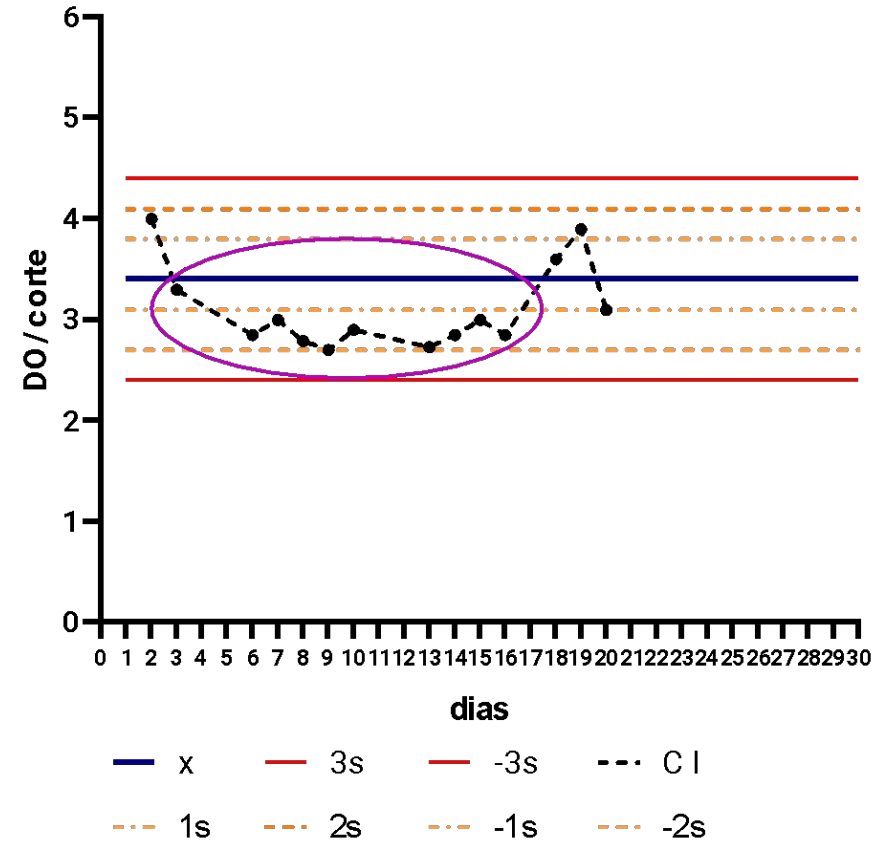
R1 3Ds

VIH CI



R4 1Ds

VIH CI



10 x

Resultados

- Los resultados de cada parámetro deberán presentarse de manera clara
- Deben ser confidenciales, por lo tanto no deben entregarse a otra persona, sin autorización.
- Cerciorarse de la posibilidad de asesoramiento posttest



Errores comunes en la Tec. de Elisa

LEER LA PLACA DESPUÉS DE TIEMPO

Error técnico o del instrumento automatizado

Vuelva a ejecutar la prueba

El producto final de la reacción de la enzima pueda precipitar y causar errores

Vuelva a ejecutar la prueba

FONDOS ALTOS

Contaminación de los reactivos

Ejecutar la prueba de nuevo con reactivos nuevos asegurándose de evitar la contaminación durante la dispensación

Etapas de lavado insuficiente

Repita el paso de lavado. Asegúrese que los well se llenen por completo,. Considere también aumentar del número de etapas de lavado

Las huellas dactilares

Limpie la superficie inferior de la placa con agua destilada y seque antes de volver a medir

Error de dispensación

Compruebe el instrumento dispensador (automático) o la técnica de pipeteo

Se observan burbujas en los well



Errores comunes en la Tec. de Elisa

REACTIVO STOP MANTIENE UNA COLORACIÓN AZUL-AMARILLA

No se mezclaron bien el reactivo de parada con el reactivo de la placa

Agite la placa con la mano o con un mixer para mezclar suficientemente los reactivos y obtener un color amarillo uniforme

ABSORBANCIAS ALTAS DE LOS CALIBRADORES QUE SALEN DE LOS LÍMITES

El tiempo de incubación de la etapa de sustrato o reactivo(s) fue más largo que el especificado

Contaminación de los controles y calibradores

Valores de calibradores y controles incorrectos. *Revise los valores en los frascos o en el certificado.*



Errores comunes en la Tec. de Elisa

Los reactivos/muestras no están a temperatura ambiente

Dispense muestras/reactivos sólo cuando todos están a temperatura ambiente para evitar la variación de la temperatura a través de los pocillos de la placa

ABSORBANCIAS BAJAS

El volumen de reactivo es bajo

Verifique el buen funcionamiento de la pipeta y su calibración

Aumento de la humedad en la placa

Asegúrese que los pocillos no utilizados se sellen adecuadamente en la bolsa con el desecante

Etapas de lavados muy extensas

Si se ocupa un equipo de lavado automático, reduzca la presión del dispensado del equipo.

Si el lavado es manual, procure que el remojo de los well no sea demasiado extenso ni que esté realizando más lavados de los necesarios



Protocolo para la realización del testeo de VIH y su entrega de resultados

Estas pautas de atención a personas que soliciten análisis de VIH y reciban sus resultados se desarrolló en el marco de la Ley 27.675 de Respuesta Integral al VIH, hepatitis virales, otras ITS y tuberculosis, para las prácticas de los laboratorios de análisis clínicos privados de todo el país. Se realizó con el asesoramiento de la Fundación Huésped.

Pasos a seguir en la solicitud de análisis y entrega de resultados de screening de Anticuerpos anti VIH

1) SOLICITUD DE ANÁLISIS

El paciente que llega con o sin pedido médico, según lo normado en el artículo 15 de la ley 27.675, tiene derecho a solicitar una serología para VIH y realizarse el test.

Si tiene pedido médico se lo ingresa como fue solicitado (nombre propio o sigla) y se lo hace firmar en el dorso.



¡Gracias!

Dr. Raul Fernando Venezuela

fernando.venezuela@unc.edu.ar

+54351-3311267