

Procesamiento de Pruebas Biológicas

FECHA: 17/Sep/2024

**1. Objeto**

Estandarizar el proceso del montaje de pruebas biológicas en el banco de sangre.

**2. Alcance**

Aplica para las pruebas biológicas que se realizan en el banco de sangre: HIV, Antígeno de superficie de hepatitis B, anticuerpos hepatitis C, Chagas, hepatitis B Core total, Sifilis, HTLV.

**3. Generalidades****Principio pruebas biológicas**

Las pruebas de control biológico realizadas a las muestras de sangre de los donantes, pretenden definir si esa sangre puede causar enfermedades y otros efectos indeseables en el receptor; todo ello en correspondencia con uno de los principios del código de ética de la transfusión sanguínea: "la salud del donante y del receptor deberá ser protegida".

Los microorganismos transmisibles por la sangre tienen entre otras las siguientes características: persisten mucho tiempo en circulación, confieren el estado del portador, son responsables de enfermedades con períodos de incubación muy largos, pueden causar infecciones asintomáticas, son estables en sangre almacenada y en muchos casos en fracciones plasmáticas. Para detectar estos agentes infecciosos, existen un gran número de pruebas, pero ninguna garantiza el 100 % de seguridad, situación que ha llevado a cualificar el proceso de selección del donante, dado que una adecuada selección, disminuye el riesgo de transmisión e incrementa la seguridad de la transfusión.

Todos los test procesados por el instrumento de medición Vitros 3600 se basan en una reacción de quimioluminiscencia amplificadas, Se realizan los siguientes test: HIV 1+2, Anticuerpos para HCV, Antígeno de Superficie para HB, Anticuerpos Core Total para Hepatitis B, Anticuerpos frente antígenos específicos de Treponema pallidum(TP) , Anticuerpos para Chagas y Anticuerpos contra el HTLV.

Se añade una muestra a un pocillo recubierto con material de captura específico para un test, el cual se encuentra ubicado en el anillo exterior, se añade al pocillo hasta 2 reactivos específicos del test, en el incubador el pocillo se agita a 37 °C, durante la reacción se captura en la superficie del pocillo un complejo que contiene el analito a detectar y el conjugado marcado de HRP: peroxidasa de rábano picante, luego se lava el pocillo con solución de lavado universal para eliminar cualquier material que no se fije a la superficie, se añade reactivo de señal al pocillo lavado iniciando la reacción de quimioluminiscencia amplificada.

La HRP del complejo, fijado a la superficie del pocillo, cataliza la oxidación del derivado del luminol produciendo luz ; el reactivo de señal contiene además un agente de transferencia de electrones que aumenta el nivel de luz producida y prolonga su tiempo de emisión. El luminómetro lee la luz emitida por el pocillo y la convierte a una señal electrónica. La concentración del analito se determina por interpolación a partir de una curva de calibración.

**4. Calibración de las pruebas.**

La calibración es específica del lote del test , los kits de reactivos y los calibradores son específicos de un número de lote de reactivos. Los calibradores vienen listos para el uso, se deben conservar entre 2 °C y 8 °C hasta la fecha de caducidad, después de abierto conservar hasta 13 semanas entre 2 °C-8 °C. Debido a que se observa que el calibrador del antígeno de superficie para hepatitis B, no esta conservando la estabilidad en las 13 semanas sugeridas, el proveedor (OCD) recomienda alicuotar en 300 µl y congelar durante las semanas establecidas.

Mezclar los calibradores cuidadosamente por inversión 3-4 veces, servir la cantidad que el equipo solicite en copilla, dejar atemperar durante 10 min, mezclar con pipeta y punta nueva 4 veces, procesar calibración. Para el calibrador del antígeno de superficie se recomienda descongelar a 37 °C y procesar.

El equipo tiene una curva maestra para cada nuevo lote de reactivos, se determinan las concentraciones de los calibradores a procesar en el sistema a partir de la calibración maestra. Cuando se procesan los calibradores, las señales luminosas esperadas de la curva maestra se comparan con las señales luminosas generadas de los calibradores y se calcula la diferencia en porcentaje entre los dos conjuntos de señales.

La validez de la curva de calibración se determina frente a un rango de parámetros de calidad, si es aceptable se almacena para ser utilizada con cualquier kit de reactivos de ese lote. Se requiere una calibración cuando expira el intervalo de calibración, definido como 28 días excepto para la prueba de HTLV, cuando se carga un lote de reactivos diferente y además también cuando observamos una tendencia o cambio en el control de calidad o si se han realizado cambios en el equipo por parte de ingeniería.

**Como calibrar**

- a. Cargue el reactivo que desea calibrar
- b. Saque los calibradores de la nevera y déjelos a temperatura ambiente durante 30 min
- c. Coloque los tubos en los rotoretes con los adaptadores de altura.
- d. Programar la calibración: Entro en el ícono de Muestras ubicado en la parte superior de la pantalla. En la parte inferior de esta pantalla se encuentra Progr. de cal., entro al ícono, a continuación, ingreso a el ícono Definir Nueva Cal, allí le asigno el nombre de la calibración (sería el nombre de la prueba que se va a calibrar), escojo la prueba a calibrar y le doy guardar y asignar. Inmediatamente aparece una pantalla con la prueba donde se debe elegir el lote a calibrar. Escojo el lote y le doy siguiente. Aparece en la pantalla la lista de trabajo, asignamos

la posición y el Vitros 3600 automáticamente asigna el número del rotor. Guardamos con la opción terminar y presiono el botón iniciar. e. Otra opción para calibrar es ubicar el calibrador con el código de barras así afuera, el instrumento de medición automáticamente reconoce el calibrador y realiza la respectiva calibración.  
Una vez pipeteado el calibrador guardo inmediatamente en nevera.

#### Como revisar calibración

Para revisar la calibración selecciono **opciones y Revisar/editar calibración** selecciono la prueba a revisar y le doy **revisar calibraciones** y aparecerá la calibración como actual si fue exitosa; el equipo imprime automáticamente el reporte de calibración y este es archivado.

Cuando aparece el mensaje " calibración fallida" verificar si los calibradores han sido procesados o si su lectura no ha sido exitosa. Si faltó por procesarse alguno de los calibradores, coloque de nuevo el rotor con el calibrador e inicie de nuevo el muestreo. Chequee el reporte de la calibración como exitosa o completa.

### 5. Manejo de los reactivos

No agite los reactivos, luego de su recepción en el laboratorio déjelos al menos 24 h en reposo.

Para cargar el reactivo en el equipo debe aparecer el foco de la estación de carga en verde.

Cada reactivo puede estar dentro del sistema hasta 2 meses, 24 h antes de cumplirse el tiempo comienzan a salir mensajes de alerta sobre el vencimiento del tiempo del reactivo en el equipo.

Los reactivos abiertos se pueden almacenar en el refrigerador en una caja cerrada con su respectivo desecante.

Cuando un código de barras se daña, se puede cargar el reactivo en forma manual, digitando el número que aparece al lado del código de barras, antes de cargar el reactivo cubrir el código y el lector al no detectarlo dará la opción para digitar el código.

Si al cargar el reactivo salen alarmas en el sistema, verificar el estado del kit por reactivos/estado , si aparece vacío es porque probablemente existen burbujas; descargue y espere 1 hora para cargarlo. **IMPORTANTE** luego de tres intentos fallidos de cargar el reactivo el sistema, este desactivará la posibilidad de cargarlo.

#### Reactivo de señal

Puede permanecer 7 días cargado en el sistema.

Debe permanecer 45 min fuera del refrigerador antes de ser cargado en el sistema.

El reactivo se carga automáticamente si existe otro en la posición de carga, ya que posee un sistema de inventario automático.

Es importante siempre chequear el inventario y tener cargado uno en la segunda posición.

#### Solucion de lavado Universal y Botella de desecho

Se pueden cambiar mientras el sistema esté en funcionamiento, la botella de desecho puede lavarse con alcohol isopropílico al 70 %, no usar Hipoclorito.

**IMPORTANTE:** Revisar siempre antes de iniciar el trabajo, el volumen de la solución de lavado universal.

La solución de lavado universal se usa para lavar los pocillos en el centro de procesos y para limpiar el sistema asociado de tubos.

### 6. Funcionamiento del sistema

- a. Realizar mantenimiento periódico
- b. Cargue y verifique reactivos y suministros (confirme que tenga en uso mínimo 50 pruebas en el reactivo de señal en la posición de uso, en la posición de carga debe estar uno nuevo y la solución de lavado universal mínimo en 2000 ml).
- c. Realice calibraciones cuando sea necesario, teniendo en cuenta los intervalos apropiados.
- d. Realice el control de calidad para verificar el rendimiento del sistema.
- e. Coloque las muestras en el rotor universal con las etiquetas de código de barras visibles y cargar.
- f. Inicie el procesamiento
- g. Retire los rotores de muestras procesados del sistema.
- h. Revise los resultados.

#### CONTROL DE CALIDAD INTERNO

**El procesamiento y análisis del desempeño de los controles de calidad debe realizarse antes del montaje de las pruebas de los donantes y tendrán una vigencia de 24 horas**

Cada que se realizan pruebas biológicas se corren los controles de calidad comerciales de cada prueba y el control interno positivo.

Para el manejo de los controles de calidad comerciales debemos tener en cuenta que se conservan entre 2 °C-8 °C hasta la fecha de caducidad, para reconstituirlos se deben atemperar entre 15 min y 30 min y seguir las instrucciones de preparación para cada control HIV y HCV se deben preparar con un mililitro de agua destilada y HBsAg con 1,6 ml de agua destilada, (para garantizar la calidad del agua destilada se utiliza la ampolla de Corpaul) dejar en reposo por 30 min, mezclar suavemente por inversión 3-4 veces y conservar entre 2 °C-8 °C por 5-10 días, el control del HBsAg se realizan alícuotas de 200 ml y se congelan hasta su uso, los controles para Syphilis TPA y Hepatitis B Core total y Chagas y HTLV, vienen listos para su uso. Antes de usar se deben atemperar 10 min, mezclar por inversión 3-4 veces y servir 200 µl en copilla (HIV-HCV-HBsAg, HBc, Syphilis y Chagas).

El control de calidad interno para HIV, HCV,HBsAg, Chagas, Core total y HTLV se adquieren a la casa comercial Quik (Biorad), su presentación es líquido listo para el uso, se conservan sin abrir hasta la fecha de caducidad entre 2 °C-8 °C, vienen listos para el uso, se debe servir en la copilla, dejar atemperar entre 10-15 min, mezclar con pipeta con punta nueva 3 veces. Este control permite comparación interlaboratorios y se utiliza el Software Unity Realtime para el manejo de los resultados. El control de calidad interno de la Syphilis, se prepara con muestra de un donante cuyo resultado este cerca al punto de corte, y al cual se le realizan diluciones, se conserva en Congelación, descongelar a 37 °C, mezclar con pipeta con punta nueva 3 veces. Es el único control de preparación interna.

HIV: 3 niveles, 2 positivo y 1 negativo.

Virotrol HIV antígeno

HCV: 2 niveles, 1 positivo y 1 negativo.

HBsAg: 2 niveles, 1 positivo y 1 negativo.

Syphilis TPA: 2 niveles, 1 positivo y 1 negativo

HBc: 2 niveles, 1 positivo y 1 negativo.

CHAGAS: 2 niveles, 1 positivo y 1 negativo

HTLV: 2 niveles, 1 positivo y 1 negativo

### **Como programar el control de calidad**

Por MUESTRAS, digito el nombre del control así:

HIV 1 /HIV 2/HIV 3; HCV 1/ HCV 2; HBS 1/ HBS 2; SYPH 1/SYPH 2; HBc1/HBc2, CRUZ 1/ CRUZ 2;HTLV 1/HTLV ;4 los controles internos: VTROL(para HIV, HC,HB, HTLV) VSPY (para Sifilis) VTCHAG (CHAGAS); VTHIV (HIV), selecciono el número del rotor y doy la posición, inmediatamente aparece el símbolo de control de calidad. A continuación selecciono el tipo de test, doy GUARDAR /SIGUIENTE y así con cada control.

Una vez tengamos el resultado se debe registrar y revisar cada uno en las gráficas en el software Unity real Time.

**Importante:** Una vez realizados los controles de calidad, la coordinación del banco de sangre revisa el desempeño de los controles, además se realiza la revisión y aprobación en el programa de calidad para pruebas biológicas, (los datos ingresados y las gráficas). Se deja evidencia de esta revisión con la firma de la coordinación, fecha y hora en la primera hoja de los controles de calidad, para autorizar el inicio de la corrida. En los casos en los que se encuentra un control de calidad que no cumpla con los rangos establecidos se procede a realizar análisis del caso y posteriormente se toman las medidas necesarias (se describen a continuación). No se inicia una corrida, sin que la totalidad de los controles de calidad sean aceptados (aprobados).

### **Desviación de las gráficas:**

Cuando se presenta un cambio en el comportamiento de las gráficas es importante analizar teniendo en cuenta los tipos de errores que se pueden presentar:

\* Error aleatorio: Se denominan errores aleatorios a aquellos que se deben a las pequeñas variaciones que aparecen entre observaciones sucesivas realizadas por el mismo observador y bajo las mismas condiciones. Las variaciones no son reproducibles de una medición a otra y se supone que sus valores están sometidos tan sólo a las leyes del azar y que sus causas son completamente incontrolables para un observador. Los errores aleatorios poseen, en su mayoría, un valor absoluto muy pequeño y si se realiza un número suficiente de medidas se obtienen tantas desviaciones positivas como negativas. Y, aunque con los errores aleatorios no se pueden hacer correcciones para obtener valores más concordantes con los reales, si pueden emplearse métodos estadísticos, mediante los cuales se pueden llegar a algunas conclusiones relativas al valor más probable en un conjunto de mediciones. Cuando se sospecha este tipo de error se debe revisar estandarización del método, manejo y reconstitución de calibradores y controles, uso de pipetas calibradas, fluctuaciones de temperatura y humedad, rotación de personal, fluctuaciones de voltaje. Se debe repetir el control con una alícuota nueva después de revisar el procesamiento del control e identificar posibles causas del desvío del desempeño.

\*Error sistemático: Se denomina error sistemático a aquel que es constante a lo largo de todo el proceso de medida y, por tanto, afecta a todas las medidas de un modo definido y es el mismo para todas ellas. Estos errores tienen siempre un signo determinado y las causas probables pueden ser: - Errores instrumentales (de aparatos); por ejemplo, el error de calibrado de los instrumentos. - Error personal: Este es, en general, difícil de determinar y es debido a las limitaciones de carácter personal. Como, por ejemplo, los errores de paralaje, o los problemas de tipo visual. - Errores de método de medida, que corresponden a una elección inadecuada del método de medida; lo que incluye tres posibilidades distintas: la inadecuación del aparato de medida, del observador o del método de medida propiamente dicho. Cuando se tiene un error sistemático se debe verificar uso del calibrador, estabilidad, concentración, matriz del calibrador, frecuencia de calibración, revise cambio de lote de calibrador, trazabilidad del método de la determinación con la concentración del calibrador. Despues de identificar la causa del error y corregir se debe procesar nuevamente el control de calidad.

### **CONTROL DE CALIDAD EXTERNO**

\* Mensualmente, se envían unas muestras al Laboratorio Departamental, se deben enviar el total de las muestras positivas y el 2 % de las muestras negativas.

El Laboratorio Departamental realiza un análisis de concordancia para los diferentes bancos de sangre, igualmente este laboratorio envía al banco de sangre un listado general con los resultados de concordancia que son guardadas en el archivo del Banco de sangre.

\* Participamos en el control de calidad del Colegio Americano de Patólogos el cual consta de 3 envíos al año, , las muestras vienen listas para su uso. Los resultados se ingresan en la página del CAP y allí mismos se consultan los resultados.

\* Otro control externo que se procesa es el del Instituto Nacional de Salud Pública, el cual consta de dos envíos al año.

### **7. RPR NOSTICON - Serología (Plan de contingencia)**

RPR Nosticón es una prueba de aglutinación no treponémica macroscópica y se utiliza para detectar la reagina. Cuando se mezclan una gota de suero positivo y reactivo en un potaobjetos, se forma una floculación negra que puede verse macroscópicamente debido a la presencia de partículas de carbón. Cuando no hay presencia del anticuerpo reagina , no se produce la aglutinación y el aspecto es de color gris uniforme.

#### **Metología**

Los reactivos y las muestras deberán estar a temperatura ambiente (15 °C-30 °C) antes de iniciar la prueba.

- a. Utilizar una pipeta nueva para cada muestra. Es importante mantener la pipeta en posición vertical para garantizar que se dispensa una gota con precisión.
- b. Con la pipeta montada y un tapón de succión , tomar muestra suficiente y transferir una gota a un círculo de la tarjeta de ensayo.
- c. Utilizando la espátula, extender la muestra por todo el área del círculo de prueba.
- d. Asegurese de que la suspensión del antígeno está homogénea agitando suavemente la botella de dispensación de plástico + la aguja que contiene la solución del antígeno.
- e. Sostener la botella en posición vertical y dispensar una gota en el mismo círculo **iNo agitar!**
- f. Colocar la tarjeta inmediatamente en el agitador y hacer girar a 100 rpm, leer los resultados luego de 8 min.

#### **Prueba semicuantitativa**

Para diluir una prueba positiva, preparar una dilución en serie de la muestra con suero salino fisiológico y comprobar cada dilución como en la prueba cualitativa.

#### **Control de calidad**

El kit trae 2 controles, 1 positivo y 1 negativo realizar la prueba como en un paciente.

#### **Interpretación de los resultados**

Prueba cualitativa: Leer los resultados inmediatamente una vez transcurridos los 8 min , leer a simple vista , preferiblemente con buena luz. Una reacción negativa aparecerá como una concentración de carbón suave en el centro del círculo o como una suspensión gris uniforme

que ocupa todo el circulo de la prueba.

Una reacción positiva débil se caracteriza por una concentración de agregados negros finos rodeados por un área difusa de agregados negros finos.

Una reacción positiva es la producción de agregados negros que se observa mayoritariamente en todo el circulo de prueba.

#### Reporte de resultados

Una vez se han pasado los resultados al sistema de información y se han validado, se imprimen y archivan en la carpeta de serologías.

Se firman los reportes por el bacteriólogo responsable, y se coloca nombre del reactivo, No de lote, fecha de vencimiento y casa comercial.

#### 8. Bibliografía

Operator's guide Vitros ECI. Orthoclinical diagnostics 2007.

Instrucciones de uso VITROS Immunodiagnostic products Syphilis TPA reagent pack y syphilis TPA calibrator 2011-08-24

Test Elisa Chagas III GrupoBios S.A 2008-10-28.

VERSION	FECHA	RAZON DE LA ACTUALIZACION
02	31/Jul/2009	Se cambia fundamento de las pruebas y metodología, se anexa fundamento de electroquimioluminiscencia, manejo del equipo VTROS ECI, controles calibraciones y manejo de reactivos.
03	04/Ago/2009	Se adiciona separación de muestras en la centrífuga.
04	04/Oct/2010	Cambiar CC HBsAG,CC HCV ,CC HIV,por CONTROL INTERNO y escribo correctamente amplificada,e iniciando.
05	24/Ago/2011	Se adiciona manejo de calibradores, del control de calidad comercial y los internos de las pruebas de HIV,HCV, HBsAg y Chagas. Se adiciona bibliografia.
06	28/Oct/2014	Se adiciona instrucciones de uso en el VITROS ECI de la prueba anticuerpos frente antigenos específicos del Treponema pallidum. Se adicionan instrucciones para el Chagas Bioschile. Se elimina en bibliografia lo referente al Tecan y se adiciona la bibliografia referente al Chagas y a la sifilis. Se adiciona lo referente a Hepatitis B anticore Ig M y HTLV I+II.
06	25/Feb/2015	Se revisa y no se modifica.
07	11/Ago/2015	Se actualiza control de calidad externo e interno. Se cambia el titulo de calibración de equipo por calibración de pruebas. Se adiciona tipo de errores que se pueden presentar.
07	31/Ago/2016	Se revisa y no se modifica.
07	16/Feb/2017	Se revisa y no se modifica.
08	31/May/2017	Se modifica la conservación y el manejo del calibrador para la prueba de antígeno de superficie de hepatitis B.
08	16/Ene/2018	Se revisa y no se modifica.
08	14/Ene/2019	Se revisa y no se modifica
09	23/Mar/2020	Se actualiza procesamiento de prueba de Chagas, se retira procesamiento de control de calidad externo con proasecal.
09	13/Ene/2021	Se revisa y no se modifica
10	05/May/2021	Se adiciona HTLV en el Vitros ECI. Se elimina el punto 8 Anticuerpos para CHAGAS Bioschile (Plan de contingencia) y Anticuerpos para HTLV I y II Murex
10	10/Ene/2022	Se revisa y no se modifica
11	16/Ene/2023	Se ajusta según instrucciones del Vitros 3600.
12	08/Jun/2023	Se adiciona el procesamiento y análisis del desempeño de los controles y la vigencia de los controles.
12	12/Ene/2024	Se revisa y no se modifica.
13	18/Sep/2024	Se adiciona en la revisión y aprobación del control de calidad por parte de la coordinación del banco de sangre.



ELABORO	REVISÓ	APROBO
<b>Nombre:</b> Yulime Andrea Monsalve Martinez <b>Cargo:</b> Dirección de Calidad <b>Fecha:</b> 17/Sep/2024	<b>Nombre:</b> Sandra Milena Arango Vanegas <b>Cargo:</b> Coordinación Banco de sangre <b>Fecha:</b> 17/Sep/2024	<b>Nombre:</b> Carlos Gonzalo Robledo Restrepo <b>Cargo:</b> Director General <b>Fecha:</b> 18/Sep/2024