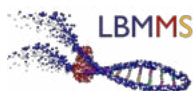
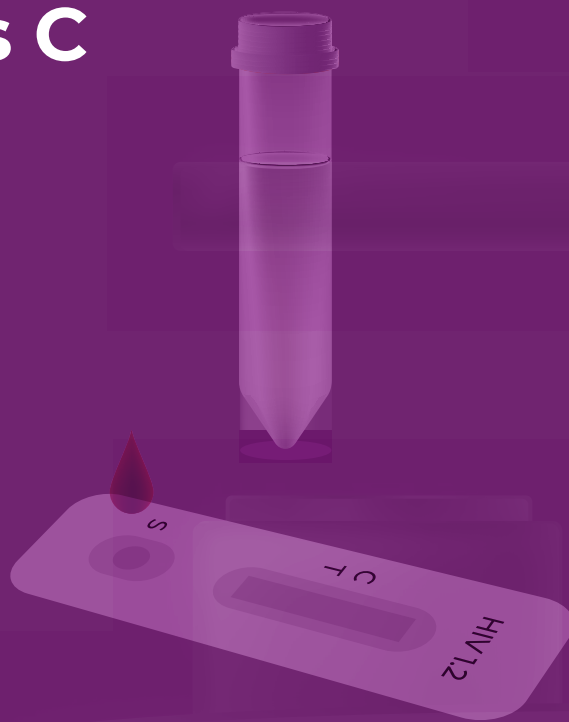


Protocolo Único para la Elaboración de Paneles de Muestra Seca en Tubo para Control de Calidad de Pruebas Rápidas de VIH, Sífilis y Hepatitis C



GOBIERNO DEL
PARAGUAY

MINISTERIO DE
SALUD PÚBLICA Y
BIENESTAR SOCIAL



Ministerio
de Salud
Pública



ANLIS
MALBRÁN
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS
E INSTITUTO DE SALUD DEL CARIÓTIPO Y MALBRÁN



Ministerio
de Salud
República Argentina

GOBIERNO
DE BRASIL

CRÉDITOS

Comisión de VIH del Mercosur

Argentina

Mariana Ceriotto, Juan Adrián Sotelo, María Soledad Alonso, Roxana Aquino

Brasil

Draurio Barreira Cravo Neto, Ana Francisca Kolling, Tatiana Silva Estrela

Paraguay

Elena Candia, Alma Barboza

Uruguay

Renee Diverio, Victoria Mainardi

Coordinación General

Dirección de Respuesta al VIH-ITS-Hepatitis Virales y Tuberculosis (Argentina)

Departamento de HIV/Aids, Tuberculose, Hepatites Virais e Infecções Sexualmente Transmissíveis (Brasil)

Elaboración y Redacción de contenidos

Diana Belén Vita, Patricia Galarza, Maria Luiza Bazzo, Álisson Bigolin, Renata Cristina Messores Rudolf, Mónica Díaz, Sara Vladimirsky

Colaboraciones

María Laura Suárez Ornani, Ana Claudia Philippus, Martin Vacchino

Diseño

Cynthia Beduino

Edición 2024

Está permitida la reproducción total o parcial de este material y la información contenida, citando la fuente.

AGRADECIMIENTOS

La CIVIH Mercosur agradece a los equipos técnicos, bioquímicos y otros profesionales de la salud que participaron del proceso de elaboración del presente protocolo.

Argentina:

- **Laboratorio de Referencia en Infecciones de Transmisión Sexual. INEI, ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”**

Patricia Galarza, Diana Belén Vita, Mónica Díaz, Martin Vacchino

- **Laboratorio de Referencia para Hepatitis Virales. INEI, ANLIS “Dr. C. G. Malbrán”**

Sara Vladimirsky, Daniela Ríos

- **Instituto de Investigaciones Biomédicas en Retrovirus y SIDA, INBIRS UBA-CONICET**

Horacio Salomón, Federico Remes Lenicov

Brasil:

- **Laboratorio de Biología Molecular, Microbiología y Serología de la Universidade Federal de Santa Catarina**

Maria Luiza Bazzo, Renata Cristina Messores Rudolf

Paraguay:

- **Laboratorio de Referencia del PRONASIDA**

Rocío Peláez, María Vera Gayoso


- **Laboratorio Central de Salud Pública**

Carmen Almada, Ma. Liz Bobadilla

Uruguay:

- **Departamento de Laboratorios de Salud Pública**

Rosario San Martín, Sylvia Molinari, María Teresa Pérez, Rosa Flieller, María Bracesco



El Protocolo Único para la Elaboración de Paneles de Muestra Seca en Tubo para Control de Calidad de Pruebas Rápidas de VIH, Sífilis y Hepatitis C de la Comisión Intergubernamental de VIH del Mercosur es una publicación de carácter técnico-científico y acceso libre, editada por la Comisión Intergubernamental de VIH de la Reunión de Ministros de Salud del Mercosur.

Su contenido está disponible en las siguientes páginas, click en la imagen:

ABREVIATURAS

BUFFER PT Buffer Fosfato Salino PBS/ Tween 20

CCE Control de Calidad Externo

CMIA Inmunoensayo Quimioluminiscente de Micropartículas

CSB Cabina de Seguridad Biológica

ELISA Ensayo por Inmunoadsorción Ligado a Enzimas (Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay, por sus siglas en inglés)

ITS Infecciones de Transmisión Sexual

LIA Inmunoensayo en Línea

MST Muestra Seca en Tubo (Dry Tube Specimen: DTS, por sus siglas en inglés)

OMS Organización Mundial de la Salud

PEEC Programa Evaluación Externa de la Calidad (nombre genérico que será definido por cada país)

POCT Pruebas en el punto de atención al paciente (Point of Care Testing, por sus siglas en inglés)

PR Prueba Rápida

PRHC Prueba Rápida de Hepatitis C

PRS Prueba Rápida de Sífilis

PRVIH Prueba Rápida de VIH

TPPA Ensayo de Aglutinación de Partículas para *Treponema pallidum*

VHC Virus de la Hepatitis C

VIH Virus de la Inmunodeficiencia Humana

ÍNDICE

PRESENTACIÓN	7
INTRODUCCIÓN	9
NORMAS DE BIOSEGURIDAD	11
EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS, SOLUCIONES Y ESTÁNDARES	12
ELABORACIÓN DE UNA MST	13
PRODUCCIÓN Y ARMADO DE PANELES DE MST	16
DISTRIBUCIÓN DE LOS KITS	19
PROCESAMIENTO DE LAS MST POR LOS CENTROS PARTICIPANTES	19
REPORTE DEL CCE	20
CONSIDERACIONES ESPECIALES	20
CRITERIOS DE APROBACIÓN	21
POSIBLES CAUSAS DE ERROR Y NO CONFORMIDADES	22
ANEXOS	23
BIBLIOGRAFÍA	31

PRESENTACIÓN


La Comisión Intergubernamental de VIH/sida del Mercosur (CIVIH) fue creada en la XIV Reunión de Ministros de Salud del Mercosur (2003), a través de la firma del Acuerdo Mercosur N° 05/03, que definió las áreas prioritarias para el VIH, el sida y la sífilis congénita (Anexo B). Es un espacio donde se discuten y trabajan temas con relación a VIH, ITS y hepatitis virales (HV) con el propósito de promover las estrategias de cooperación e integración que contribuyan a fortalecer las estrategias sanitarias regionales.

Está conformada por referentes técnicos en la materia de cada uno de los Estados Parte (EEPP): Argentina, Brasil, Paraguay y Uruguay. A su vez, esta Comisión Intergubernamental da cuenta de su labor a la Reunión de Ministros de Salud del Mercosur y Estados Asociados.

Tiene una larga tradición en sostener mecanismos de cooperación entre sus cuatro EEPP, así como en buscar apoyo de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) y otras agencias de cooperación, con el fin de expandir los mejores logros de las políticas preventivo-asistenciales en VIH y otras ITS de cada uno de los países. Esto permite que, más allá de las diferencias existentes, pueda sostenerse un marco conceptual y de prácticas que han favorecido fundamentalmente el control de la epidemia de VIH, las hepatitis virales y otras ITS.

La CIVIH trabaja ininterrumpidamente año tras año, en la elaboración de proyectos en espacios fronterizos, reuniones periódicas durante las presidencias pro t  mpore (PPT), visitas técnicas, donaciones de medicamentos, así como también ha incorporado las hepatitis virales bajo la órbita de la Comisión, desde 2018.

En esta ocasión, y, en el marco del proyecto **“Evaluación externa de la calidad de la red de diagnóstico y seguimiento de pruebas rápidas de VIH, sífilis y hepatitis virales en el Mercosur”** se presenta el **Protocolo   nico para la Elaboración de Paneles de Muestra Seca en Tubo para Control de Calidad de Pruebas Rápidas de VIH, Sífilis y Hepatitis C**, producto del trabajo realizado en las distintas PPT entre las Direcciones/Departamentos de VIH-ITS-HV, puntos focales, técnicos y profesionales bioquímicos de Argentina y Brasil a los fines de establecer criterios para brindar soporte técnico a Uruguay y Paraguay en cuanto al control de calidad y monitoreo de pruebas rápidas de VIH, sífilis y hepatitis virales. Luego de discutir metodologías, guías, manuales de procedimientos y recomendaciones que cada país utiliza, así como también la realización de visitas técnicas encabezadas por Brasil a Laboratorios de Referencia de Argentina, Paraguay y Uruguay, dicho protocolo fue formalmente consensuado en una reunión llevada a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular, Microbiología y Serología de la Universidade Federal de Santa Catarina, durante la PPT de Brasil 2023.



Celebramos poder compartir esta valiosa herramienta que ha surgido del trabajo integral y consensuado de diferentes áreas de laboratorios de los países de la CIVIH del Mercosur que permitieron poner en común algunos ejes e ideas para reforzar las buenas prácticas dentro de esta iniciativa de Control de Calidad de Pruebas Rápidas de VIH, Sífilis y Hepatitis C.

Esto sólo puede hacerse realidad en una búsqueda constante de cooperación e integración de los sistemas de salud entre los países socios del Mercosur.

En ese sentido, la posibilidad de entablar una relación más cercana con los usuarios se favorece cuando las intervenciones se ajustan a las necesidades de las personas y/o de la comunidad. Este protocolo es parte del apoyo técnico para un proceso de transformación y mejoramiento del acceso al diagnóstico y a la atención de las personas contribuyendo a la construcción de una identidad regional.

INTRODUCCIÓN

Las infecciones de transmisión sexual son enfermedades de importancia en salud pública. Por ello, resulta esencial promover estrategias para la prevención y el diagnóstico precoz con el objetivo de garantizar una pronta atención a las personas afectadas, sus parejas y evitar la transmisión materno-infantil.

El desarrollo de pruebas rápidas (PR), que utilizan técnicas de inmunocromatografía, han significado un avance como método de tamizaje, ya que son ensayos con elevada sensibilidad, que arrojan resultados instantáneos en los puntos de atención (*point of care testing*, POCT) y sin necesidad de contar con laboratorios especializados o equipamiento de alta complejidad. Sin embargo, esta situación presenta el desafío de elaborar protocolos destinados a certificar el desempeño del personal de salud que interviene en el proceso, desde la toma de muestra hasta la entrega de resultados.

Asimismo, es necesario tener presente que hay muchos países donde, por las características y heterogeneidad del territorio, resulta dificultosa la implementación de un proyecto de control de calidad sostenible, tanto por el transporte y conservación de las muestras como por las particularidades o limitaciones propias de cada centro participante.

La implementación de paneles de muestra seca en tubo (MST) o DTS “*Dried Tube Specimen*” por sus siglas en inglés, ha significado una herramienta útil para realizar el monitoreo de control de calidad de pruebas rápidas, fundamentalmente en centros de atención primaria y lugares alejados de las zonas urbanas.

En este contexto, y a fin de dar respuesta a esta problemática, surge la necesidad de elaborar un programa integral destinado a estandarizar los procesos para la vigilancia del control de calidad de las pruebas rápidas.



Propósito

Describir los lineamientos para la elaboración de paneles de MST, con el fin de ser utilizados para el control de calidad de pruebas rápidas de inmunocromatografía para la detección de anticuerpos de VIH, sífilis y VHC, satisfaciendo las necesidades de los centros participantes.

Fundamento

Consiste en el armado de paneles de MST utilizando muestras de suero o plasma de reactividad conocida que serán coloreados con colorante rojo, fraccionados y secados. Los mismos deben ser reconstituidos con buffer PBS/Tween 20 previo a la realización de las pruebas rápidas. Con esta metodología las muestras enviadas presentan estabilidad sin requerir condiciones rigurosas para su transporte y almacenamiento, con bajo riesgo biológico, admitiendo ser utilizadas para evaluar el desempeño del control de calidad externo con requerimientos mínimos en zonas alejadas de los centros urbanos y en establecimientos de salud de atención primaria o de baja complejidad. El programa de calidad para pruebas rápidas verifica el desempeño del agente de salud y, por lo tanto, los paneles de calidad son enviados a los sitios de prueba de acuerdo con el número de agentes de salud que realizan las pruebas, permitiendo detectar errores e implementar medidas correctivas para mejorar los procesos y fortalecer la confiabilidad de los resultados.

NORMAS DE BIOSEGURIDAD

Requisitos mínimos para la elaboración de paneles de MST:

- Contar con instalaciones de Bioseguridad Nivel 2 (laboratorio básico de contención baja).
- Conocer los lineamientos del Manual de Bioseguridad del laboratorio participante, así como los del Manual de Bioseguridad en el Laboratorio de la Organización Mundial de la Salud (OMS).
- Manipular las muestras, materiales y paneles con precaución, considerándolos como elementos potencialmente infecciosos.
- Conocer los procedimientos a seguir en caso de derrame biológico.
- Utilizar siempre los elementos de protección personal (guardapolvo, guantes, barbijo, gafas y calzado de seguridad).
- Trabajar bajo condiciones de orden y limpieza y evitar la contaminación cruzada.
- Limpiar las áreas de manipulación y elaboración, antes y después de trabajar, con hipoclorito de sodio 0,5% (lejía de uso comercial de 5,5 g/l) y con alcohol etílico 70% (ver **anexo 1 y 2**).
- Disponer los procedimientos de bioseguridad actualizados y realizar las capacitaciones oportunas para todo el personal, a fin de reducir los riesgos y optimizar los resultados.

EQUIPOS, MATERIALES, REACTIVOS, SOLUCIONES Y ESTÁNDARES

Materiales	Equipos	Reactivos, soluciones y estándares
Guantes de látex	Cabina de bioseguridad biológica clase II	Suero o plasma de reactividad conocida
Micropipeta 10-100 μL	Heladera	Colorante rojo líquido para alimentos
Micropipeta 100 -1000 μL	Vórtex	Agua desionizada
Puntas de 10-100 μL	Balanza analítica	NaCl: Cloruro de sodio
Puntas de 200 μL	PHmetro	KCl: Cloruro de potasio
Puntas de 1000 μL	Matraz aforado de 1000 mL	Na_2HPO_4 : Fosfato dibásico de sodio
Tubo tipo Eppendorf de 1.5 mL/tubo Falcon de 15mL o 50mL	Bomba de vacío	KH_2PO_4 : Fosfato monobásico de potasio
Microtubos estériles con fondo cónico de 2 mL que puedan permanecer parados sobre la mesada sin necesidad de apoyo		Tween 20
Gradillas para microtubos		HCl: Ácido clorhídrico
Cajas para microtubos		NaOH: Hidróxido de sodio
Etiquetas para microtubos		Alternativa comercial: Buffer fosfato salino PBS/ Tween 20 (polvo)
Pipetas Pasteur descartables de 3 ml		
Instructivo para la realización del CCE		
Planilla para recolección de resultados		
Bolsas ziplock o resellables		
Botella filtro de vacío de 0,45 μm y 0,22 μm		
Filtros de jeringa de 0,45 μm y 0,22 μm		
Bolsas de sílica gel (opcional)		

ELABORACIÓN DE UNA MST

1. Selección del suero/ plasma

Seleccionar un suero o plasma debidamente caracterizado para positividad o negatividad en el diagnóstico de sífilis, VIH y/o hepatitis C con el que se quiera realizar la MST (ver **anexo 3**). Podrán utilizarse plasmas o sueros, ya sea frescos o desfreezados. A fin de normatizar el procedimiento, este protocolo propone la utilización de plasma fresco o de bolsas de hemoterapia cuando se requieran grandes volúmenes.

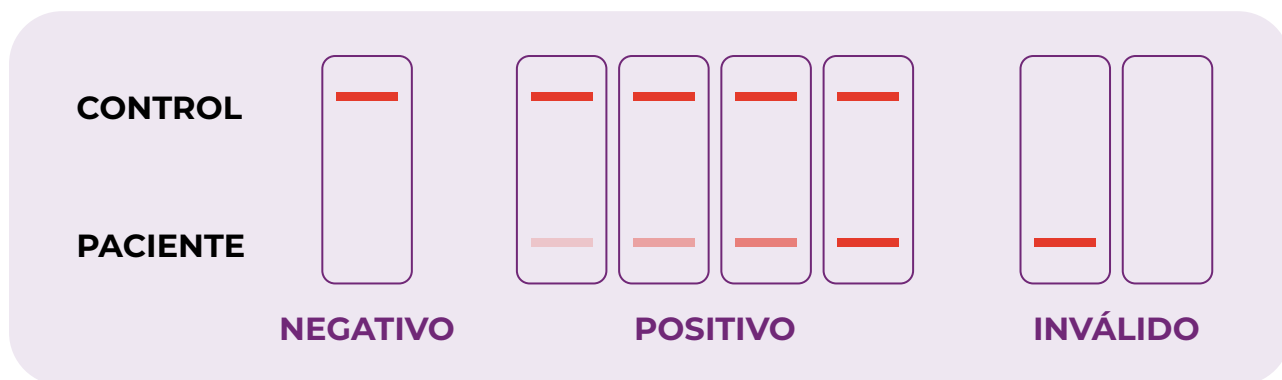
Las muestras utilizadas podrían, opcionalmente, ser sometidas a un proceso de inactivación por calor para neutralizar la infectividad de las mismas (ver **anexo 4**). A fin de eliminar los microcoágulos del suero o el excedente de fibrinógeno del plasma, las muestras deberán pasar por un proceso de clarificación por centrifugación (10 min a 700 G) y posterior filtración (ver **anexo 5**).

NOTA: no es recomendable la mezcla de sueros o plasmas para la elaboración de las MST.

2. Verificación de Reactividad del suero/plasma seleccionado

Realizar la verificación del suero o plasma seleccionado mediante el uso de la/s prueba/s rápida/s apropiada/s (VIH y/o sífilis y/o hepatitis C), según las especificaciones del fabricante. Se deben probar todas las marcas que se encuentren disponibles en el laboratorio.

- **Validez del ensayo:** Presencia de una banda en la ventana CONTROL.
- **Resultado POSITIVO:** Presencia de una banda en la ventana PACIENTE.
- **Resultado NEGATIVO:** Ausencia de una banda en la ventana PACIENTE.
- **Resultado INVÁLIDO:** Ausencia de una banda en la ventana CONTROL, con o sin banda en la ventana PACIENTE.



NOTA: La ausencia de banda en la ventana CONTROL invalida el ensayo, en ese caso repetirlo con otra prueba rápida. En el caso de que no aparezca la banda, no utilizar ese lote de pruebas rápidas e investigar las posibles causas de la falla.

3. Etiquetado

Antes de comenzar el proceso de elaboración del microtubo de MST, el mismo debe ser etiquetado con el N° de Muestra o código que se utilizara para los envíos.

4. Coloración, fraccionamiento y secado de la MST

- Alicuotar en un tubo la cantidad necesaria del suero/plasma seleccionado y agregue el 10% con la solución madre de colorante rojo para alimentos (ver **anexo 6**), por ej. 10 ml de suero/plasma con 1ml de solución madre de colorante. Otra opción es el uso de azul de tripán a una concentración final de 0,01%. Mezclar con vórtex.
- Transferir con micropipeta, 20 µl de la muestra coloreada al fondo de un microtubo con fondo cónico de 2 ml. Se sugiere utilizar el método de pipeteo inverso para agregar muestras al tubo, esto reduce la posibilidad de formación de burbujas.
- Luego de pipetear la muestra en los tubos, se sugiere limpiar los bordes de los tubos con gasas/algodón o hisopos flexibles para eliminar cualquier exceso que haya podido quedar adherido.
- Dejar secar la gota de suero/plasma coloreado manteniendo el microtubo destapado en una cabina de seguridad biológica (CSB) clase II durante toda la noche. Se sugiere dejar los tubos de muestra en una mesa durante 4 horas antes de colocarlos en la CSB. Esto permitirá que la yema de muestra seca que se formará en el fondo del tubo sea más homogénea.
- En caso de no disponer de CSB, dejar a temperatura ambiente (2°C – 30°C) en un lugar sin corriente de aire o en una habitación refrigerada siempre que el aire acondicionado cuente con un filtro limpio, el riesgo es que exista contaminación de la muestra con hongos ambientales. En caso de necesidad, pueden dejarse secando todo un fin de semana en CSB.
- Tapar el microtubo de MST elaborado.

5. Registro



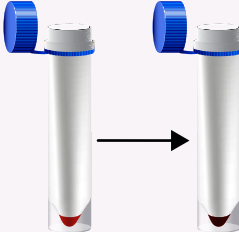

Una vez finalizado el proceso de elaboración del microtubo de MST con reactividad definida, documentar la elaboración del lote en el registro correspondiente indicando como mínimo la siguiente información:

- N° de lote
- Fecha de elaboración
- Modo de conservación
- Fecha de vencimiento

6. Almacenamiento

Almacenar el microtubo de MST refrigerado entre 2°C - 8°C.

Elaboración de una Muestra Seca en Tubo (MST)

			
1	2	3	4
Teñir el suero/plasma con la solución stock de colorante rojo para alimentos (10% volumen final).	Colocar 20 µL de suero o plasma teñido en el fondo del microtubo.	Dejar secar la muestra coloreada en el microtubo destapado durante 24 - 48 hs.	Tapar el microtubo y conservarlo refrigerado hasta elaborar los paneles.

NOTA: La estabilidad de la MST es de 30 días conservándose refrigerada. La misma podrá conservarse durante un período de 3 meses si se conserva a -80°C.

PRODUCCIÓN Y ARMADO DE PANELES DE MST

1. Consideraciones

El siguiente procedimiento detalla la elaboración de un **panel de MST**, el cual constará de 4 (cuatro) microtubos, cada uno con distinta reactividad para sífilis y/o VIH y/o hepatitis.

2. Validación de las MST

En esta etapa se evaluará la homogeneidad, estabilidad y el valor de reactividad esperada.

NOTA: La siguiente validación deberá realizarse para cada uno de los lotes de MST de diferente reactividad que hayan sido seleccionados para conformar el panel.

Homogeneidad: Este paso debe realizarse inmediatamente después de finalizada la producción de las MST (día 1).

- A. Seleccionar un muestreo aleatorio de 3 paneles completos (12 tubos de MST), y retirar del refrigerador el buffer PT previamente preparado (ver **anexo 7**), para que tome temperatura ambiente.
- B. Reconstituir las MST con buffer PT según instructivo (ver **anexo 8**).
- C. Dejar hidratar las MST por un mínimo de 3 hs. y un máximo de 24 hs. En todos los viales reconstituidos, evaluar:

Color: Observar a ojo desnudo sobre un fondo blanco el color de la solución contenida en el microtubo. (Rojo translúcido: Cumple) (Color diferente: No cumple).

Aspecto: Observar sobre un fondo negro en un ambiente iluminado el aspecto de la solución contenida en el microtubo (Translúcido: Cumple) (Opalescente/Turbio/Particulado: No cumple).

Reactividad esperada: Realizar la/s PR correspondientes según instructivo del fabricante (Reactividad de la MST = Reactividad del plasma/suero de origen: Cumple) (Cualquier otro resultado: No cumple).

Registrar el resultado de los ensayos insertando una foto de las PR ensayadas en la planilla de registro.

El lote cumple el ensayo de HOMOGENEIDAD cuando TODAS las MST cumplen en las pruebas de Color, Aspecto y Reactividad esperada.

Estabilidad:

A. El día 1 de producción, seleccionar 3 paneles completos de MST y reconstituir con Buffer PT (ver **anexo 8**).

B. Dejar hidratar las MST por un mínimo de 3 hs. y un máximo de 24 hs. En todos los viales reconstituidos evaluar:

Color: Observar a ojo desnudo sobre un fondo blanco el color de la solución contenida en el microtubo. (Rojo translúcido: Cumple) (Color diferente: No cumple).

Aspecto: Observar sobre un fondo negro en un ambiente iluminado el aspecto de la solución contenida en el microtubo (Translucido: Cumple) (Opalescente/Turbio/Particulado: No cumple).

Reactividad esperada: Realizar la/s PR correspondiente/s según instructivo del fabricante (Reactividad de la MST = Reactividad del plasma/suero de origen: Cumple) (Cualquier otro resultado: No cumple).

C. Repetir los puntos A y B a los 15 y 30 días posteriores a la producción.

Registrar el resultado de los ensayos en la planilla correspondiente, insertando una foto de las PR examinadas.

El lote cumple el ensayo de ESTABILIDAD cuando TODAS las MST cumplen en las pruebas de Color, Aspecto y Reactividad esperada en todas las pruebas.

VALIDACIÓN DE MTS

HOMOGENEIDAD	ESTABILIDAD		
T° ambiente	T° ambiente y 2-8 °C		
1 día post- producción	1 día post- producción	15 días post- producción	30 días post- producción
COLOR ASPECTO REACTIVIDAD	COLOR ASPECTO REACTIVIDAD	COLOR ASPECTO REACTIVIDAD	COLOR ASPECTO REACTIVIDAD

LOTE DE MST

NOTA: El ensayo de estabilidad puede realizarse fuera del cronograma establecido por pedido o reclamo de un usuario. En este caso, si en ese momento, el lote no cumple con las especificaciones, será dado de baja, y se comunicará a todos los usuarios de ese producto la baja del mismo.

3. Agrupamiento de los microtubos para la formación de los paneles

Cada panel estará formado como mínimo por una reactividad positiva para sífilis, una reactividad positiva para VIH y una reactividad positiva para hepatitis C. Realizar la cantidad de paneles que se requieran para el envío a los centros participantes.

4. Empaquetado de los kits del control de calidad externo (CCE) de MST

Retirar los tubos de MST del refrigerador 40 minutos antes de comenzar a empaquetar. Para el empaquetado se utilizarán bolsas *ziplock* (metalizadas o transparentes) o con sellado hermético por calor. Opcionalmente puede agregarse una bolsa de sílica gel para evitar la humedad.

La bolsa debe estar etiquetada con la siguiente información:

"CCE" Ronda N°: XX	
N° de lote del panel	Modo de conservación
N° de fecha de elaboración	N° de fecha de vencimiento

Cada uno de los kits deberá contener:

- Un panel de MST (compuesto por 4 microtubos de MST de distinta reactividad)
- Un microtubo con Buffer PT (para realizar la reconstitución de las MST)
- Una pipeta Pasteur descartable y aforada al volumen de buffer necesario (para reconstituir cada MST)
- Instructivo de procesamiento del CCE.
- Planilla para registro de los resultados del CCE.

Nota: Se sugiere el uso de una segunda bolsa que contenga el instructivo y la planilla separadas de las muestras, a efectos de evitar humedecer las mismas ante posibles derrames del buffer PT.

5. Almacenamiento de los kits de MST en el centro de testeo

Los kits de MST pueden almacenarse a temperatura ambiente (entre 2°C - 29°C) hasta su fecha de vencimiento.

DISTRIBUCIÓN DE LOS KITS

Una vez armados los paneles, los mismos deberán ser distribuidos a cada uno de los centros participantes del CCE.

PROCESAMIENTO DE LAS MST POR LOS CENTROS PARTICIPANTES

Una vez que el centro participante recibe los paneles, los operadores que participarán en la evaluación de desempeño del CCE deberán seguir las disposiciones enviadas por el LNR. En todos los casos las muestras reconstituidas deberán ser procesadas como si fuera sangre entera y seguir las instrucciones del/los kit/s utilizados. Al obtener los resultados, los mismos deben ser volcados en la hoja de registro. Los resultados finales se enviarán al LNR a través del instrumento *ad hoc* que se decida implementar (mail, formulario electrónico, página web, etc.).

REPORTE DEL CCE



El LNR será encargado de recopilar los resultados obtenidos de los centros participantes, evaluar su desempeño, elaborar los informes y efectuar el seguimiento correspondiente. El responsable local, será el responsable de implementar las medidas correctivas que fuesen necesarias para fortalecer los procesos y garantizar la calidad de las pruebas rápidas realizadas en todos los centros de testeo, involucrando a los laboratorios regionales.

CONSIDERACIONES ESPECIALES



Se podrá efectuar una ronda de calidad teórica a fin de evaluar los conocimientos teóricos comprendidos en las guías nacionales respecto a la estrategia de implementación de pruebas rápidas.

CRITERIOS DE APROBACIÓN

Se realiza una comparación entre el resultado enviado por el participante y el resultado esperado (respuesta), según las siguientes puntuaciones:

Muestra	Resultado esperado	% de respuestas correctas
1	Reactivo o no reactivo (definido en cada ronda)	25%
2	Reactivo o no reactivo (definido en cada ronda)	25%
3	Reactivo o no reactivo (definido en cada ronda)	25%
4	Reactivo o no reactivo (definido en cada ronda)	25%
Total		100%

Para validar cada muestra del panel y componer la evaluación final, al menos el 60% de los participantes deben tener resultados acordes al resultado esperado.

Los certificados y/o informes de desempeño individuales se emiten por separado para cada marcador evaluado (VIH, sífilis y VHC). Los informes de desempeño individuales presentan la puntuación obtenida por el participante y también comentarios sobre posibles fallas en la ejecución del PR.

EXCELENCIA:

Los profesionales con una respuesta 100% correcta a los criterios evaluados en la realización de las pruebas recibirán un certificado de excelencia.

APROBACIÓN:

Los profesionales que obtengan una puntuación del 75% acierto en los criterios evaluados en la realización de las pruebas recibirán un certificado de aprobación.

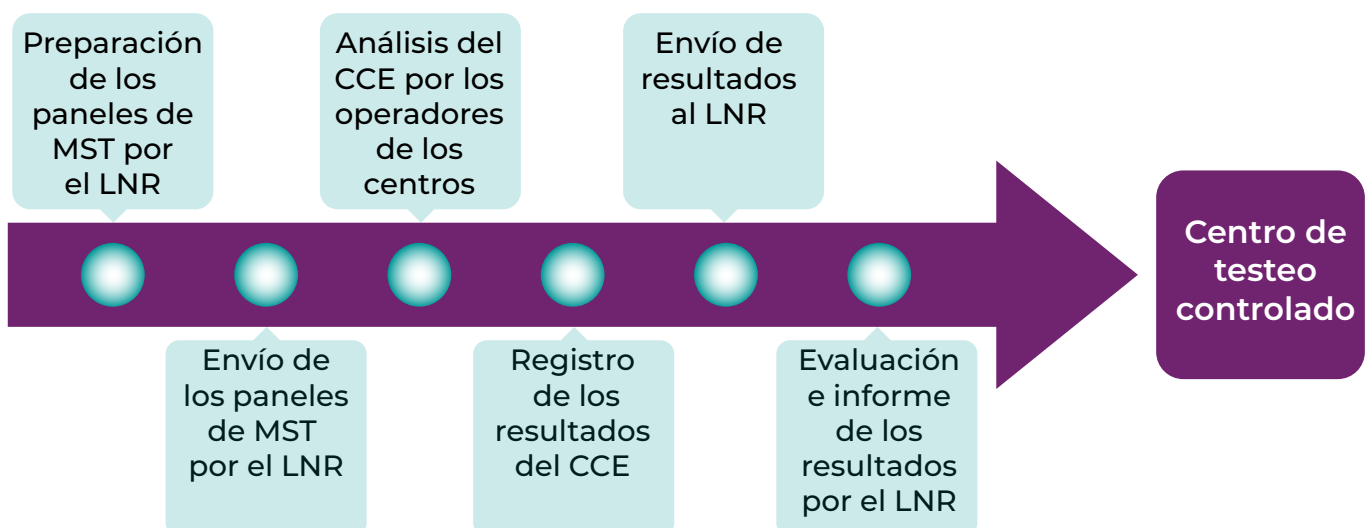
REPROBACIÓN:

No recibirán certificados. Los profesionales que obtengan una puntuación menor al 75% o utilicen kits PR caducados (kits caducados), independientemente de la puntuación obtenida al realizar las pruebas, solo recibirán un informe de desempeño individual.

POSIBLES CAUSAS DE ERROR Y NO CONFORMIDADES

- Tiempo y/o volumen inadecuado de reconstitución de los paneles.
- Procesamiento fuera de término.
- Elevada temperatura y/o humedad.
- Utilización de kits vencidos.
- Pipetear una cantidad de muestra menor o mayor que la determinada por el fabricante del kit.
- No añadir el volumen de buffer de corrida según las recomendaciones del fabricante del kit.
- No agregar el buffer de corrida al dispositivo de prueba INMEDIATAMENTE después de agregar la muestra.
- Realizar la lectura de prueba en un tiempo menor o mayor que el determinado por el fabricante del kit.
- No considerar reactivas las muestras con una línea muy débil en el área de lectura del test.
- Validar pruebas en las que no apareció la línea en el área de control.
- Intercambiar muestras.
- Cometer errores o cambiar el resultado obtenido al informar el resultado.
- Falta de entrenamiento.

Etapas del proceso del CCE



ANEXO 1. Preparación de hipoclorito de sodio al 0,5%

Procedimiento (para preparar 1 litro de solución)

En una probeta de 1 litro, colocar 100 mL de hipoclorito de sodio de uso doméstico (5,5 g/l de cloro activo) y agregarle 900 mL de agua de la canilla.

NOTA: La solución podrá utilizarse dentro de las 24 horas de su preparación.

ANEXO 2. Preparación de alcohol (etanol) al 70%

Procedimiento (para preparar 1 litro de solución) teniendo en cuenta la contracción de volumen

En una probeta de 1 litro colocar 710 mL de alcohol 96% y llevar a volumen final.

NOTA: Esta solución podrá ser utilizada dentro de un período de 7 días.

ANEXO 3. Criterios de selección y caracterización de plasmas/sueros

A.

Verificar que la muestra seleccionada no contenga partículas que interfieran en la lectura de los resultados. Los plasmas o sueros excesivamente hemolizados, ictéricos, contaminados con bacterias, quilosos o turbios, son inadecuados para los ensayos.

B.

Según se desee elaborar una MST positiva o negativa para sífilis y/o VIH y/o HCV, se deberán tener en cuenta los siguientes resultados:

- Para la evaluación de sífilis: los resultados de la serología por pruebas treponémicas (TPPA, ELISA, LIA, CMIA)
- Para la evaluación de VIH: los resultados de las pruebas serológicas (ELISA, CMIA, LIA)
- Para la evaluación de HCV: los resultados de la medición de anticuerpos por CMIA o ELISA.

C.

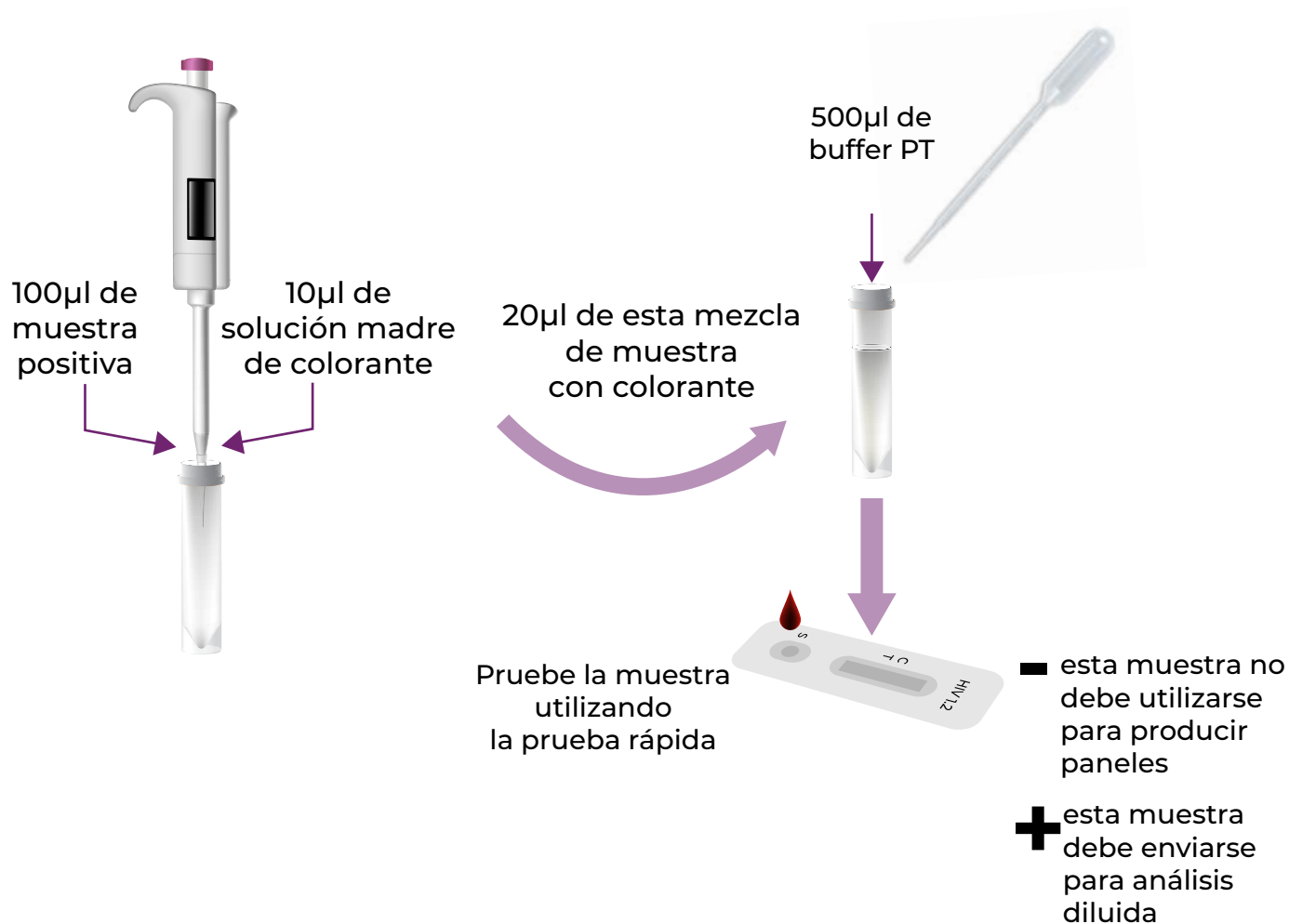
Verificar la reactividad de la muestra seleccionada, probándola pura (sin diluir) y diluida en suero/plasma negativo (considerando la dilución de suero/plasma seco en Buffer PT), para comprobar si después de la resuspensión de la MST se mantiene la reactividad en la prueba rápida. En caso de no cumplir el requisito, esa muestra no podrá utilizarse para elaborar una MST y se deberá seleccionar otra muestra y repetir el procedimiento.

NOTA: Para la elaboración de la MST podrá utilizarse un suero simultáneamente positivo para Sífilis, VIH y hepatitis, siempre que se cumplan las condiciones de reactividad anteriormente descriptas.

En este contexto, se sugiere evaluar la reactividad de la muestra de la siguiente manera:

Muestra pura:

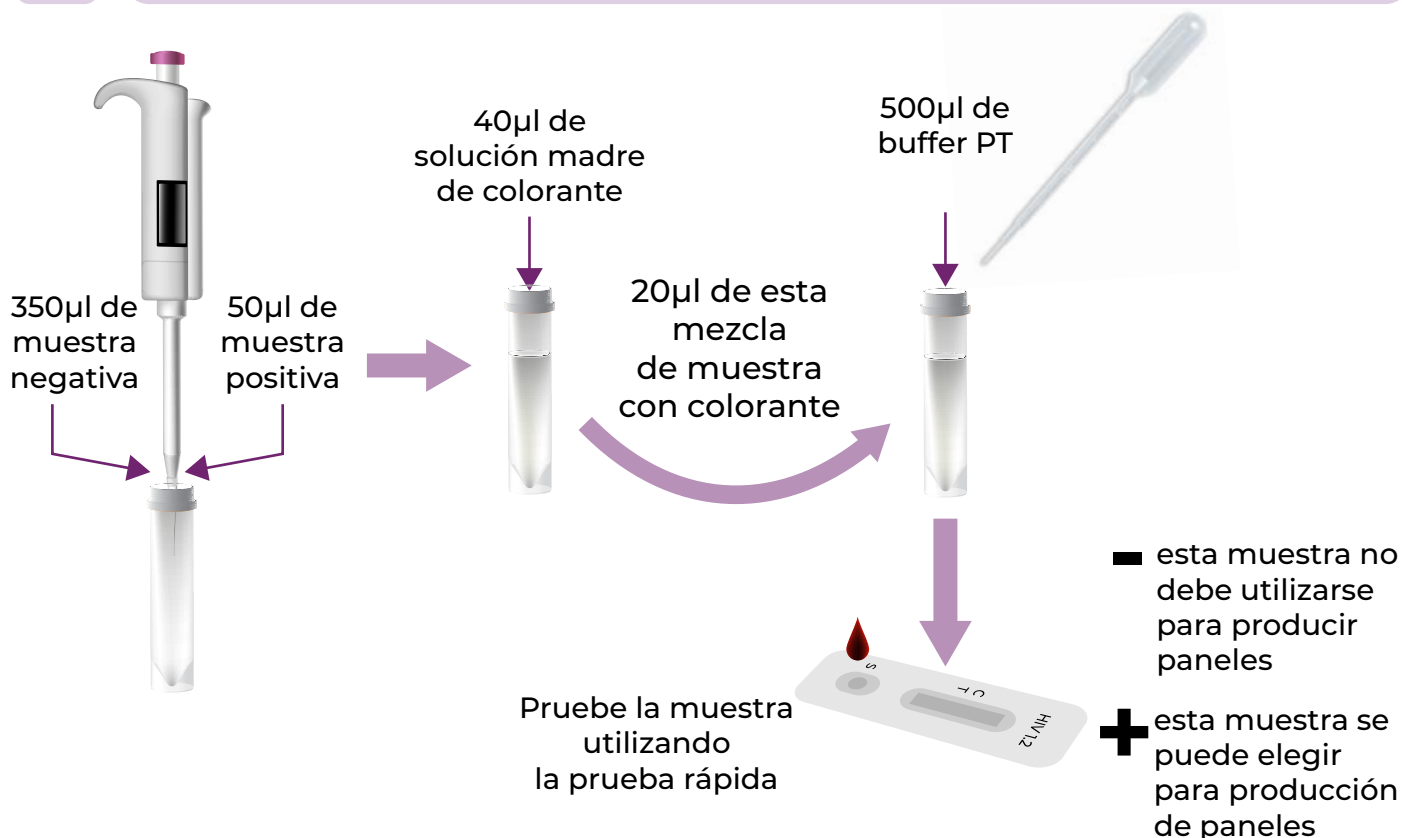
1. Pipetear 100 μ l de una muestra positiva en un tubo de fondo cónico y agregar 10 μ l de solución madre de colorante (10%).
2. Transfiera 20 μ l de esta mezcla de muestra con colorante a un tubo nuevo para simular la formación de un botón.
3. Agregar 500 μ l de solución tampón y homogeneizar.
4. Pruebe la muestra utilizando la prueba rápida disponible en el laboratorio que haya sido seleccionada con la sensibilidad más baja o la visualización de líneas débiles.
5. Si el resultado de la prueba es negativo, esta muestra no debe utilizarse para producir los paneles. Si el resultado de la prueba sigue siendo positivo, esta muestra debe enviarse para análisis diluida.



Muestra diluida:

La realización de este paso tiene como objetivo simular la pérdida de reactividad de la muestra durante el período de estabilidad y transporte del panel. Diluir la muestra utilizando un factor de dilución de 1/8.

- 1.** Pipetear 350 µl de muestra negativa en un tubo de fondo cónico y agregar 50 µl de muestra positiva (el mismo usado en el paso anterior).
- 2.** A esta muestra diluida total (400 µl) agregar 40 µl de solución madre de colorante (10%).
- 3.** Transfiera 20 µl de esta mezcla de muestra con colorante a un tubo nuevo para simular la formación de un botón.
- 4.** Agregar 500 µl de solución tampón y homogeneizar.
- 5.** Pruebe la muestra utilizando la prueba rápida disponible en el laboratorio que haya sido seleccionada con la sensibilidad más baja o la visualización de líneas débiles (el mismo usado en el paso anterior).
- 6.** Si el resultado de la prueba es negativo, esta muestra no debe utilizarse para producir los paneles. Si el resultado de la prueba sigue siendo positivo (incluso si es más débil que en la muestra pura), esta muestra se puede elegir para la producción de paneles.



ANEXO 4. Inactivación de suero/plasma humano potencialmente infeccioso (opcional)

Procedimiento:

- A.** Fraccionar el suero/ plasma bajo BSL3 en tubos de 2 mL.
- B.** Alicuotar la muestra de suero/ plasma en los tubos sin llenar por encima del 50 % de la capacidad total de los tubos y taparlos.
- C.** Sumergirlos en baño de agua a 56°C durante 30 minutos, asegurándose de que el agua del baño quede por encima del volumen de la muestra.

ANEXO 5. Proceso de filtración de suero/plasma

Procedimiento: *Filtración con botellas filtro y bomba de vacío.*

- A.** Homogeneizar el suero/plasma por medio de movimientos envolventes. Eventualmente pasar a un recipiente estéril para facilitar el trasvasado.
- B.** Conectar la bomba de vacío a la unidad filtrante de 0,45 µm.
- C.** Trasvasar una pequeña fracción de muestra a la unidad filtrante de 0,45 µm. Filtrar.
- D.** Repetir el paso C hasta filtrar todo el volumen de muestra.
- E.** Conectar la unidad filtrante de 0,22 µm a la bomba de vacío.
- F.** Tomar una fracción de la muestra filtrada (con poro de 0,45 µm) y colocar en la unidad filtrante de 0,22 µm. Filtrar.
- G.** Repetir el paso E hasta completar el volumen total de muestra.

ANEXO 5. Proceso de filtración de suero/plasma

Continuación

Procedimiento: *Filtración con filtros de jeringa.*

- A.** Homogeneizar el suero/plasma realizando movimientos envolventes.
- B.** Tomar con la jeringa una pequeña alícuota de la muestra y pasar a través del filtro de 0,45 μm . Recoger el filtrado en un recipiente estéril.
- C.** Repetir el paso B hasta filtrar todo el volumen de la muestra.
- D.** Tomar con la jeringa una fracción de la muestra filtrada (con poro de 0,45 μm) y pasar a través de un filtro de 0,22 μm . Recoger el filtrado en un recipiente estéril.
- E.** Repetir el paso D hasta filtrar el volumen total de la muestra.

ANEXO 6. Preparación de solución madre de colorante comestible rojo al 20% p/v

Procedimiento:

- A.** En una balanza pesar 1 g. de colorante comestible rojo.
- B.** Trasvasar el colorante pesado a un tubo cónico de centrífuga.
- C.** Adicionar 5 mL de agua destilada y tapar el tubo.
- D.** Homogeneizar la solución por inversión y con vórtex.

Se sugiere conservar la solución madre por un máximo de 6 meses bajo refrigeración (2°C a 8°C).

ANEXO 7. Elaboración de Buffer fosfato salino PBS/ Tween-20 (PT)

Procedimiento:

- A.** Disolver 8,00 g de NaCl, 0,20 g de KCl, 1,44 g Na₂HPO₄ y 0,24 g KH₂PO₄ en 800 ml de agua destilada.
- B.** Con una micropipeta agregar 500 µl de Tween-20. Verificar el pH. Ajustarlo a 7,4 con NaOH 0,1 N ó HCL 0,1 N en caso de ser necesario.
- C.** Llevar a volumen final de 1000 mL con agua destilada en matraz aforado.
- D.** Esterilizar en autoclave 15 minutos a 121 °C.
- E.** Fraccionar en condiciones de esterilidad en alícuotas de 1ml en microtubos estériles.
- F.** Etiquetar los tubos con la identificación Buffer PT y la fecha de expiración con plazo de un año desde la fecha de elaboración.
- G.** Conservar en heladera entre 2°C - 8°C. El Buffer PT que no se fracciona puede ser conservado en heladera entre 2°C - 8°C por el plazo de un año.
- H.** Rotular el recipiente del reactivo y los microtubos fraccionados con número de lote, fecha de elaboración, fecha de vencimiento y condiciones de almacenamiento.

NOTA: El siguiente instructivo describe las cantidades de reactivos necesarios para preparar 1000 mL de Buffer PT.

Alternativa comercial: puede utilizarse Buffer fosfato salino PBS/Tween-20 en polvo para preparar 1 litro de solución. Esterilizar por filtración.

ANEXO 8. Reconstitución de una Muestra Seca en Tubo (MST)

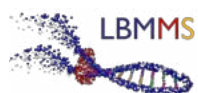
Procedimiento:

- A.** Reconstituir el vial de MST hasta la marca de la pipeta provista (volumen aproximado 200 µl).
- B.** Dar pequeños golpes al vial con los dedos para facilitar la homogeneización de la MST con el buffer PT.
- C.** Dejar el vial tapado a temperatura ambiente durante un mínimo de 3 Hs. y un máximo de 24 Hs. para su hidratación.
- D.** Luego de transcurrido ese tiempo, dar nuevamente pequeños golpes al vial con la mano, a fin de homogeneizar la muestra.
- E.** Utilizar la muestra reconstituida y homogeneizada inmediatamente.
- F.** Realizar la/s prueba/s rápida/s (PRS, PRVIH y PRHC) agregando el volumen de muestra reconstituida especificada por el fabricante.

NOTA: En todos los casos realice el procedimiento como si trabajara con sangre entera.

BIBLIOGRAFÍA

1. Parekh, B. S., Anyanwu, J., Patel, H., Downer, M., Kalou, M., Gichimu, C., Keipkerich, B. S., Clement, N., Omondi, M., Mayer, O., Ou, C.-Y., & Nkengasong, J. N. (2010). Dried tube specimens: A simple and cost-effective method for preparation of HIV proficiency testing panels and quality control materials for use in resource-limited settings. *Journal of Virological Methods*, 163(2), 295–300. <https://doi.org/10.1016/j.jviromet.2009.10.013>
2. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). Universidade Federal de Santa Catarina. (2018). AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE. DOS TESTES RÁPIDOS. Módulo 1: Entendendo o programa AEQ-TR.
3. Ministério da Saúde Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Vigilância, Prevenção e Controle das IST, do HIV/Aids e das Hepatites Virais (DIAHV). (2018). AVALIAÇÃO EXTERNA DA QUALIDADE. DOS TESTES RÁPIDOS. Módulo 2: AEQ-TR – Da hidratação do painel até o envio do resultado.
4. Guía para la utilización de pruebas rápidas de sífilis. (2018). Dirección de Sida, ETS, Hepatitis y TBC. Secretaria de Salud. Ministerio de Salud y Desarrollo Social. Argentina.
5. Modelo estándar de manual de procedimientos y calidad para la implementación de test rápidos de VIH. (2017). Dirección de Sida y ETS, Ministerio de Salud de la Nación. Argentina.
6. Benzaken, A. S., Bazzo, M. L., Galban, E., Pinto, I. C., Nogueira, C. L., Golfetto, L., Benzaken, N. S., Sollis, K. A., Mabey, D., & Peeling, R. W. (2014). External quality assurance with dried tube specimens (DTS) for point-of-care syphilis and HIV tests: experience in an indigenous populations screening programme in the Brazilian Amazon. *Sexually transmitted infections*, 90(1), 14–18. <https://doi.org/10.1136/sextrans-2013-051181>
7. (s.f.). https://media.tghn.org/articles/IMPLEMENTATION_2.pdf
8. (s.f.). <https://docplayer.es/66684136-Katherine-soto-coordinador-de-laboratorio-cisne-marina-chiappe-coordinador-de-laboratorio-patricia-garcia-investigador-principal.html>
9. Montefiori Laboratory Duke University. (2021). Protocol for Heat-Inactivation of Serum and Plasma Samples. https://hcv.lanl.gov/content/hab-reference-strains/html/Protocol-for-Heat-Inactivation-of-Serum-and-Plasma-Samples_October-2021.pdf
10. G Kerber - Validação do uso de corante vermelho na produção de amostra controle para teste rápido (2021). Tesis - repositório.ufsc.br
11. Farmacopea argentina (7a ed.) (2003a). Ministerio de Salud de la Nación.



GOBIERNO DEL
PARAGUAY

MINISTERIO DE
SALUD PÚBLICA Y
BIENESTAR SOCIAL



MINISTERIO DE
SALUD

Gobierno
de Brasil



Ministerio
de Salud
Pública



ANLIS
MALBRÁN
ADMINISTRACIÓN NACIONAL DE LABORATORIOS
E INSTITUTO DE SALUD "DR. CARLOS MALBRÁN"



Ministerio
de Salud
República Argentina