

Universidad Nacional Autónoma De Nicaragua
Instituto Politécnico De La Salud Dr. Luis Felipe Moncada
Departamento de Bioanálisis Clínico y Microbiología



Monografía para optar al título de Licenciatura en Microbiología.

Tema: Estabilidad de paneles de proficiencia para el control de calidad externo de Dengue utilizando muestra seca en tubo, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia en el periodo comprendido de Julio a Diciembre del 2016.

Autores:

Br(a). María Celeste Portobanco Rivas

Br. Mario Augusto Vega Campos

Tutor/Asesor:

MSc. Felipe Agustín Torres Meneses.

Especialista de laboratorios en salud y Responsable del diagnóstico de la serología de VIH en el CNDR-MINSA.

Managua, Nicaragua Mayo del 2017

Índice

1. Introducción:	8
2. Antecedentes	9
3. Justificación:	11
4. Planteamiento del problema:	13
5. Objetivo General:	14
6. Marco teórico.....	15
6.1. LA FAMILIA DE NORMAS ISO 9000:2000	16
6.2. CONCEPTOS BÁSICOS UTILIZADOS POR ISO 9000:2000.....	18
6.3. LA ESTRUCTURA DE ISO 9001:2000.....	21
6.3.1. REQUISITOS DE LA DOCUMENTACIÓN.....	22
6.4. Programa de garantía de la calidad.....	23
6.4.1. Principios generales.....	23
6.4.2. Definición y ámbito de aplicación.....	24
6.4.3. Preparación.....	25
6.5. Sistema de Gestión de la Calidad en Laboratorios Clínicos ISO 15189	26
6.5.1. Principales requisitos.....	26
6.5.2. Ventajas para la organización.....	27
6.5.3. Ventajas para los clientes	27
6.6. Muestras secas en tubo (MST):.....	28
6.7. Controles internos.....	30
6.7.1. Tipos de controles internos.....	30
6.8. Evaluación externa de la calidad	32
7. Diseño Metodológico	36
8. Análisis y discusión de los Resultados.....	45
9. Conclusiones.....	52
10. Recomendaciones	53
11. Bibliografía	54
12. Anexos	

Siglas y Abreviaturas

CDC: Centro de Control de Enfermedades
CEC: Control Externo de la Calidad
CEN: Comité Europeo de Normalización
CNDR: Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia
DBS: Dry Blood Spot (Muestra Seca en Tubo)
EEC: Evaluación Externa de la Calidad
ELISA: Ensayo Inmunoensimático Ligado a Enzima
GFCV: Gabinetes de la Familia, Comunidad y Vida
IgG: Inmunoglobulina G
IgM: Inmunoglobulina M
ISO: Organización Internacional de Normalización
MINED: Ministerio de Educación
MINSA: Ministerio de Salud
MST: Muestra Seca en Tubo
OMS: Organización Mundial de la Salud
TMB: Tetrametil Bencida
PBS: Buffer Fosfato Salino
PC: Paneles de Competencia
PEEC: Programa de Evaluación Externa de la Calidad
PEPFAR: fondo de emergencia del presidente de los estados unidos ante el VIH en el mundo
POEs: Procedimiento Operativo Estandarizado
PP: Panel de Proficiencia
PT: Pruebas de Aptitudes
SGC: Sistemas de Gestión de Calidad
SSI: Instituto de Ciencias Sostenible
VIH: Virus de Inmunodeficiencia Humana

Evaluación del Tutor

Ha sido para mí un enorme placer haber podido ser parte del presente estudio, para lo cual agradezco a sus autores por permitirme ser partícipe de esta importante etapa de formación profesional de la cual Maria Celeste Portobanco y Mario Vega Campos son sus literatos.

Sabemos que afortunadamente nuestras autoridades de salud han hecho múltiples esfuerzos para contrarrestar los efectos nocivos generados por la epidemia del dengue, pero a pesar de ellos la ser prevalencia por este virus es elevada. Y se incrementa aún más la preocupación por este virus debido a la aparición de otros patógenos tales como Chikungunya y Zika. sin embargo eso no nos debe de llevar a tener una actitud pasiva ante la silente epidemia del dengue a nivel mundial, que bueno que existen personas que se inspiran a estudiar cada día más sobre este tema, sin escatimar esfuerzos que en un futuro van a propiciar beneficios para la población nicaragüense y para el Sistema de salud pública.

Hablar de infección por virus como el dengue debería ser la base material de estudio de elección en la mayoría de investigaciones en salud que se hagan en nuestro país, sean estas del pregrado, postgrado o nivel de maestría y así evitar que nuestros indicadores sean azotados de una forma tal, que no podamos controlarlo o no estemos preparados para intervenciones eficaces en salud para este flagelo.

Atentamente,

MSc. Felipe Agustín Torres Meneses

Especialista de laboratorio en salud CNDR – MINSA

Resumen

El presente estudio surgió debido a la necesidad de buscar un método que hiciera posible realizar el control externo de la calidad en el área de serología de dengue en todas las unidades de salud del país que tienen capacidad instalada para la realización del diagnóstico serológico de dengue. Hasta el año 2016 el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia procesa el 10% de las muestras negativas y el 100% de las muestras positivas como control externo de la calidad en dengue.

Esto implica costos muy elevados ya que se debe utilizar; logística para el transporte de las muestras, producción de reactivos, insumos de laboratorio, equipos de laboratorio, asignación de mayor cantidad de personal, instalaciones adecuadas de laboratorio etc.

En serología de VIH implementaron el uso de la muestra seca en tubo para el control externo de la calidad para el diagnóstico de VIH utilizando pruebas rápidas, y los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

Se decidió probar si la muestra seca en tubo era viable para ser utilizada en serología de dengue para el control de la calidad. Se preparó la muestra seca en tubo siguiendo los mismos procedimientos aplicados en el área de serología de VIH en donde ya se implementó el uso de la MST para control externo de las pruebas rápidas de VIH. Luego se incubaron tanto las muestras positivas como las negativas a tres diferentes temperaturas ($4 - 8^{\circ}\text{C}$, temperatura ambiente y a 37°C), durante diferentes periodos de tiempo (10 días, 20 días y 30 días).

Los resultados obtenidos fueron: Que las muestras a temperatura de $4 - 8^{\circ}\text{C}$ y a temperatura ambiente mantuvieron su positividad y negatividad en los tres diferentes periodos de tiempo, todo lo contrario con las muestras incubadas a 37°C . Cabe señalar que las densidades ópticas que evidencian muestras características positivas y negativas fueron las que se procesaron a los 10 días.

Otro resultado relevante de la investigación fue: lograr verificar que el uso de la muestra seca en tubo fue estable a los diez días después de ser preparadas las muestras. Por lo que se concluye que si es factible utilizar la muestra seca en tubo para el control externo de la calidad de dengue.

Dedicatoria

En primer lugar dedicamos este loable trabajo a nuestro ser superior que en nuestro caso es Dios, quien nos doto de la sabiduría necesaria para alcanzar la meta de ser Buenos profesionales.

Además dedicamos de todo corazón este trabajo a nuestros queridos padres, quienes a pesar de sus dificultades no escatimaron esfuerzo alguno para enseñarnos el camino para ser personas socialmente útiles.

Ellos nos orientaron en pro de que aprendiéramos a ser: disciplinados, responsables, honestos, y que siempre nos llenáramos de paciencia y valor para alcanzar las metas que nos propusiéramos en la vida, por muy difíciles que estas fuesen.

Bra. María Celeste Portobanco Rivas

Br. Mario Augusto Vega Campos

Agradecimiento

A mí DIOS, mi padre divino y amigo inseparable, que desde que nos decidimos a estudiar esta profesión, nos concedió del aliento y de las fuerzas necesarias para no perder nunca las esperanzas de un día alcanzar el objetivo planteado.

El me ordeno: “Mira que te mando: que te esfuerces y seas valiente, no temas ni desmayes porque Yo, el Señor, tú DIOS estaré contigo donde quiera que tú vayas.”

Josué 1:9

Y mi más sincero agradecimiento a mi tutor y amigo MSc. Felipe Torres Meneses, quien se caracteriza por ser exigente en su trabajo, pero sus exigencias en lugar de molestarnos nos incentivaron a sacar adelante nuestro trabajo.

Bra. María Celeste Portobanco Rivas

Br. Mario Augusto Vega Campos

1. Introducción:

El dengue es una infección vírica transmitida por la picadura de las hembras infectadas de mosquitos del género *Aedes*. Es una enfermedad similar a la gripe que afecta a lactantes, niños pequeños y adultos. Los síntomas aparecen 3–14 días (promedio de 4–7 días) después de la picadura infectiva. Existen cuatro serotipos de virus del dengue (DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4). Predomina más en los climas tropicales y subtropicales de todo el planeta, sobre todo en las zonas urbanas y semiurbanas.

Está presente en unos 120 países del mundo, en el trópico y el subtropico, pudiendo así afectar a la salud de más de 2.500 millones de personas que viven en ellos, ya sea en zonas urbanas y periurbanas o rurales.

La incidencia anual se estima en unos 40 millones de personas, con unas 500.000 hospitalizaciones por dengue hemorrágico o shock del dengue. El 90% de los casos generales se dieron en menores de 15 años. La tasa promedio de mortalidad es del 5%, con unas 24.000 muertes anuales por esta enfermedad y sus complicaciones.

El mayor brote notificado hasta la fecha ocurrió en Vietnam en 1987, durante el cual se notificaron aproximadamente unos 370.000 casos. En el año 2016 Nicaragua acumula 1,127 casos de dengue y ocho muertes por esa enfermedad, informó el Ministerio de Salud (MINSa).

Tomando en cuenta los resultados observados de la muestra seca en tubo (MST) en el control externo de VIH, se decidió probar la MST para el control externo de la calidad en serología de dengue.

En serología de VIH implementaron el uso de la muestra seca en tubo para el control externo de la calidad para el diagnóstico de VIH utilizando pruebas rápidas, y los resultados obtenidos fueron satisfactorios.

2. Antecedentes

En el periodo de 1996 al 2001 se distribuyeron y procesaron cuatro controles externos de la calidad del diagnóstico serológico del dengue en la Región de las Américas. En el que se realizaron controles externos de la calidad del diagnóstico serológico del dengue en 1996-1997, 1998-1999, 1999-2000 y 2000-2001. Paneles compuestos por 20 sueros (12 de estos positivos a anticuerpos IgM contra el dengue) fueron enviados a laboratorios de la Región para que participaran en los controles realizados. RESULTADOS: Un total de 27 laboratorios recibió 59 paneles de sueros de 1996 a 2001, y se recibieron los resultados del análisis de 54 de esos paneles (91,5 por ciento). De 1 080 sueros (20 X 54), 95.6 por ciento coincidieron con el laboratorio de referencia en cuanto a los resultados de la detección de anticuerpos IgM contra el dengue. Además, en 47 paneles (87 por ciento) la coincidencia con el laboratorio de referencia se observó en 90 por ciento de las muestras del panel o más. De los 27 paneles para los cuales se recibieron los resultados de los títulos de anticuerpos IgG contra el dengue, 22 (81.5 por ciento) coincidieron con el centro de referencia. Tomando en conjunto los cuatro controles realizados, 22 laboratorios coincidieron con el centro de referencia en 90 por ciento de las muestras o más y 13 en 100 por ciento de las muestras en cuanto a la presencia de IgM. Los resultados indican que la mayoría de los laboratorios participantes mostraron un excelente desempeño en la detección de anticuerpos IgG e IgM contra el dengue. (Guzmán M., 1996-2001)

En el año 2010 Chin-Yih Ou comprueba la utilidad de la muestra seca en tubo para elaborar paneles de proficiencia para el control externo de la calidad en el diagnóstico de VIH. Los resultados de este estudio fueron los siguientes: Se evaluó un panel de 303 muestras secas en tubo (MST) (135 positivos para el VIH y 168 negativos para el VIH) con dos pruebas rápidas. La sensibilidad y la especificidad con la prueba de Determinar VIH-1/2 fueron de 99,3% y 99,4%, respectivamente, y con OraQuick fueron de 98,5% y 100%, respectivamente. Los estudios de estabilidad mostraron que los anticuerpos específicos del VIH en los especímenes de muestra seca en tubo (MST) eran estables a 4 grados C y 25 grados C durante 4 semanas, con una disminución sólo marginal a 37 grados C y 45 grados C durante 4 semanas. El programa de aptitud (PT) basado en MST fue probado con éxito en 24 sitios de pruebas en Kenia. Los resultados demuestran que la

MST es un método práctico simple de usar para preparar y distribuir paneles (PT) y muestras de control de calidad para monitorear las prácticas de prueba del VIH (Bharat S. Parekha, 2010).

En los países apoyados por PEPFAR se desarrollaron capacitaciones al personal de laboratorio para elaborar paneles de proficiencia utilizando la muestra seca en tubo (MST). Posteriormente el CDC de Atlanta sugirió que en cada país se hiciera un piloto para constatar la utilidad del método.

En Nicaragua se efectuó el piloto en Octubre del año 2013, donde participaron 13 unidades de salud del SILAIS Managua y los resultados fueron satisfactorios. En año 2015 y 2016 se efectuaron la segunda y tercera ronda de control externo de la calidad en pruebas rápidas de VIH usando la MST, en ambas rondas ya se incluyeron las 27 principales unidades de salud del SILAIS Managua y los resultados obtenidos fueron óptimos en cuanto a la concordancia (Ampie O., 2016).

En el área de serología de VIH del CNDR se implementó el uso de la muestra seca en tubo (MST) para producir paneles de proficiencia para el control externo de la calidad de las pruebas rápidas de VIH. Los cuales fueron analizados y se obtuvieron resultados satisfactorios. Posteriormente se decidió distribuirlos y probarlos en diferentes unidades de salud del SILAIS Managua y a la fecha se han realizado 3 rondas. Y los resultados han sido excelentes. Este tipo de muestra después de ser preparada es estable durante un mes a temperatura ambiente, esto hace posible prescindir de la cadena de frío y tener muestras óptimas para ser procesadas en un mes como máximo. Los resultados obtenidos en las tres rondas efectuadas en las unidades de salud del SILAIS Managua, realizando control externo de la calidad usando muestra seca en tubo para pruebas rápidas de VIH se detallan a continuación: En la Ronda 1 (VIH01-13) se obtuvo una concordancia del 86.66% y de un 13.33% de insatisfactorios. En la ronda 2 para la evaluación de la calidad externa utilizando los paneles de Proficiencia determinaron que la concordancia en la ronda VIH02-15 fue de un 100%. En la Ronda No. 3 (VIH03-16) La evaluación de la calidad externa en los paneles de Proficiencia determinaron que los valores concordantes constituyeron un 83.33% y para los no concordantes fue de 2.38%. y no reportados a tiempo un 14.28% (Ampie O., 2016).

3. Justificación:

El control externo de la calidad en las diferentes pruebas diagnósticas siempre ha sido un reto por razones tales como: Utilización de diferentes técnicas, muchos centros haciendo pruebas, no estandarización de los procedimientos, falta de documentación, tipos de muestras utilizadas, resistencia al cambio, capacitación y actitud del personal.

Por todo lo antes mencionado los sistemas de gestión de la calidad han hecho grandes esfuerzos por implementar sistemas de control de la calidad con la finalidad de llevar resultados de pruebas de laboratorio confiables a todos los usuarios.

Para realizar el control externo de la calidad en dengue en Nicaragua como en la mayoría de los países de Latinoamérica se ha estado utilizando suero o plasma lo que significaba mantener una cadena de frío estable para lograr preservar los especímenes en buen estado, pero esto requiere de incurrir en muchos gastos y en ocasiones las muestras no llegaban en estado óptimo a su destino. Además hay riesgo de derrames y riesgo biológico.

En el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia en pro de mantener y promover la emisión de resultados confiables y de calidad a todos los pacientes que demandan o requieren un diagnóstico de dengue, ha implementado el procesamiento del 10 % de todas las muestras negativas y el 100% de todas las muestras positivas. Pero para poder mantener esta metodología de control de calidad se incurre en altos costos que implican: Producción de muchos kit de pruebas, demanda de congeladores para almacenamiento de las muestras, equipos de laboratorio y personal capacitado. Por los motivos antes expuestos es que es de sumo interés probar que los paneles de proficiencia haciendo uso de la técnica de muestra seca en tubo son funcionales para realizar el control el control externo de la calidad, con la finalidad de promover se cambie la metodología que actualmente está establecida, lo cual permitirá además de hacer el proceso de control externo de la calidad en las diferentes unidades de salud disminuir los costos de forma considerable.

Por todo lo antes expuesto el principal objetivo de esta investigación radica en demostrar que la muestra seca en tubo (MST) es estable a temperatura ambiente, de ser así existirá

la posibilidad de cambiar el sistema o la metodología para efectuar el control externo de la calidad en dengue a nivel de todas las unidades de salud que realizan pruebas para el diagnóstico serológico de dengue.

El aporte científico de este estudio consiste en comprobar y demostrar que la muestra seca en tubo es viable en costo – beneficio para implementar el control externo de la calidad de dengue en Nicaragua. Si las autoridades deciden y aprueban implementar la MST para la EEC en dengue los beneficiarios serian:

- El Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR) porque: no tendrá que preparar las cantidades de reactivo de ELISA de captura de IgM dengue para procesar las grandes cantidades de muestras que ingresan para control de calidad procedentes de los diferentes SILAIS, los analistas del CNDR no tendrán que procesar tanta cantidad de muestras para evaluar la calidad, no será necesario contar con grandes espacios para el almacenamiento de las muestras de control de calidad, se estará evaluando de manera periódica la exactitud, precisión y confiabilidad de los resultados que emiten los laboratorios que procesan dengue, de acuerdo al rendimiento que tengan todos los laboratorios al CNDR le será posible aplicar medidas preventivas y correctivas en caso de ser necesario.
- Los laboratorios de referencia de los SILAIS en Nicaragua: No tendrán que estar enviando tantas cantidades de muestras para el control de la calidad, evitaran el almacenamiento de muestras que guardan para control de calidad, evitaran estar embalando muestras y preparando documentación para enviar los especímenes para la EEC.
- Usuarios: Si el método de la MST se implementa de manera periódica se lograra monitorear la calidad de los resultados que están siendo emitidos a la población. De tal manera que se comprobara la calidad de los mismos.

4. Planteamiento del problema:

El Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia (CNDR Minsa) procesa anualmente grandes cantidades de muestras procedentes de las unidades de salud del SILAIS Managua, inclusive de las empresas medicas previsionales para el diagnóstico de dengue. El diagnostico serológico se realiza con una técnica de ELISA de IgM de captura de dengue, el cual es producido en el CNDR, esto implica muchos gastos porque además de procesar las muestras de Managua se debe abastecer a los centros de referencia de 11 SILAIS del país que procesan dengue. Lo antes mencionado demanda de mucha carga de trabajo y de gasto de muchos insumos para producir los reactivos.

Además es de imperante necesidad asegurar y garantizar la calidad de los resultados que emiten los centros de referencia, es por esa razón que todos los laboratorios que procesan dengue tienen que enviar al CNDR el 10 % de los negativos que procesan y el 100% de los positivos a dengue. Esta situación genera una serie de inconvenientes tales como: Producir más reactivos, almacenar muchas muestras en el CNDR, más carga de trabajo para quienes procesan las muestras de control de calidad.

Con la finalidad de disminuir el gasto de reactivos, el desgaste del personal y mantener un control externo de la calidad en dengue se ha considerado demostrar que los paneles de proficiencia utilizando muestra seca en tubo sean viables. Si esto queda demostrado será de mucho provecho el implementar una EEC con la MST para sustituir el sistema que actualmente está establecido.

¿Cuál es la estabilidad de los paneles de proficiencia para el control de calidad externo de Dengue utilizando muestra seca en tubo, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia en el periodo comprendido de Julio a Diciembre del 2016?

Hipótesis

Se mantendrán estables la musetra seca en tubo a temperatura de 4 a 8°C, a temperatura ambiente y a 37°C a los 10 días, a los 20 días y a los 30 días de incubación.

5. Objetivo General:

Demostrar la estabilidad de los paneles de proficiencia para el control de calidad externo de Dengue utilizando muestra seca en tubo, en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia en el periodo comprendido de Julio a Diciembre del 2016.

Objetivos específicos:

- Enumerar las etapas para la elaboración de los Paneles de Proficiencia para el control externo de la calidad de dengue.
- Comparar los resultados obtenidos de los pool de muestras frescas versus muestra seca en tubo por el método de ELISA de captura de IgM para el diagnóstico de dengue.
- Verificar la estabilidad de la muestra seca en tubo en diferentes periodos de tiempo y a diferentes temperaturas, por medio del método de ELISA de captura de IgM dengue.

6. Marco teórico

El dengue es una infección vírica transmitida por la picadura de las hembras infectadas de mosquitos del género *Aedes*. Es una enfermedad similar a la gripe que afecta a lactantes, niños pequeños y adultos. Los síntomas aparecen 3–14 días (promedio de 4–7 días) después de la picadura infectiva. Existen cuatro serotipos de virus del dengue (DEN 1, DEN 2, DEN 3 y DEN 4). Predomina más en los climas tropicales y subtropicales de todo el planeta, sobre todo en las zonas urbanas y semiurbanas (Anonimo, 2016).

Los síntomas son: fiebre elevada (40C°) acompañada de dolor de cabeza muy intenso, dolor detrás de los globos oculares, dolores musculares y articulares, náuseas, vómitos, agrandamiento de ganglios linfáticos o sarpullido.

El dengue grave es una complicación potencialmente mortal porque cursa con extravasación de plasma, acumulación de líquidos, dificultad respiratoria, hemorragias graves o falla orgánica.

No hay existe ningún tratamiento específico para el dengue ni el dengue grave, pero la detección oportuna y el acceso a la asistencia médica adecuada disminuyen las tasas de mortalidad por debajo del 1%.

El dengue está presente en unos 120 países del mundo, en el trópico y el sub-trópico, pudiendo así afectar la salud de más de 2.500 millones de personas que viven en ellos, ya sea en zonas urbanas, periurbanas o rurales (Anonimo, 2016).

La incidencia anual se estima en unos 40 millones de personas, con unas 500.000 hospitalizaciones por dengue hemorrágico o shock del dengue. El 90% de los casos generales se dieron en menores de 15 años. La tasa promedio de mortalidad es del 5%, con unas 24.000 muertes anuales por esta enfermedad y sus complicaciones.

El mayor brote notificado hasta la fecha ocurrió en Vietnam en 1987, durante el cual se notificaron aproximadamente unos 370.000 casos.

El dengue es endémico en África Subsahariana, en Sudamérica Tropical, Centroamérica, el Asia Suroriental y el Sureste Asiático (India, Bangladesh, Pakistán y Sri Lanka).

Es importante destacar que el n° de casos está aumentando y además se está extendiendo a nuevas áreas, donde da lugar a epidemias de tipo explosivo. Antes de 1970, solo 9 países habían sufrido epidemias de dengue grave. Sin embargo, ahora la enfermedad es endémica en más de 100 países y en las últimas 5 décadas su incidencia ha aumentado en 30 veces. Esta situación se explica por la interacción de muchos factores:

- El crecimiento de la población y la urbanización incontrolada, sobre todo en países tropicales en vías de desarrollo, lo que da lugar aún deterioro de los sistemas de higiene municipales.
- La falta de control eficaz de las poblaciones de mosquitos en zonas endémicas.
- El aumento de los viajes en avión, que facilita el transporte del virus entre países.

El empeoramiento general, por falta de recursos, de las estructuras de Salud Pública de muchos países en los últimos 30 años.

En los últimos años se han registrado epidemias de dengue y/o dengue hemorrágico. En Latinoamérica, región en la que está aumentando particularmente la incidencia. Durante el año 2010 se han registrado brotes de dengue en varios países de la región, con un número total de casos que han superado los datos históricos registrados. Se notificaron más de 1,6 millones de casos, de los cuales 49.000 correspondían a formas graves, falleciendo más de 1000 personas.

Los países con brotes registrados fueron Bolivia, Brasil, Colombia, Guatemala, Honduras, Nicaragua, México, Perú, Puerto Rico, República Dominicana, Venezuela y otros países y territorios en el Caribe Inglés y francés. (Anonimo, 2016)

6.1. LA FAMILIA DE NORMAS ISO 9000:2000

Los trabajos de la Organización Internacional de Normalización (ISO) concluyen en acuerdos internacionales que son publicados con la forma de Normas internacionales. Se entiende por Norma aquellos acuerdos documentados que contienen especificaciones técnicas u otros criterios precisos, destinados a ser utilizados sistemáticamente como reglas, directrices o definiciones de características para asegurar que los materiales, procesos y servicios sean aptos para su empleo.

La familia ISO 9000 constituye un conjunto coherente de normas y directrices sobre gestión de la calidad que se han elaborado para asistir a las organizaciones, de todo tipo y tamaño, en la implementación y la operación de sistemas de gestión de la calidad (SGC) eficaces. Esta familia la forman:

- La Norma ISO 9000: Sistemas de gestión de la calidad – Fundamentos y vocabulario.
- La Norma ISO 9001: Sistemas de gestión de la calidad – Requisitos.
- La Norma ISO 9004: Sistemas de gestión de la calidad – Directrices para la mejora continua del desempeño.
- La Norma ISO 19011: Directrices para la auditoría medioambiental y de la calidad.

En la familia ISO 9000 se utiliza el término organización para designar un conjunto de personas e instalaciones con una disposición de responsabilidades, autoridades y relaciones. Esto incluye denominaciones como compañía, corporación, organización, fundación, organismo, asociación, o una parte o combinación de ellas (Sistema de Gestión de la Calidad según ISO 9001:2000, 2005).

La norma internacional ISO 9001 especifica los requisitos para los SGC, genéricos y aplicables a organizaciones de cualquier sector económico e industrial con independencia de la categoría del producto/servicio. Son complementarios a los requisitos del producto/servicio, que pueden ser especificados por los clientes, por la propia organización o por disposiciones reglamentarias.

ISO 9001 especifica los requisitos para un SGC eficaz en el cumplimiento de las especificaciones del cliente y es la base para que, en su caso, una tercera parte (ajena a la organización y al cliente) pueda certificar que el SGC es conforme a los requisitos de dicha norma. En cambio, ISO 9004 proporciona una orientación sobre un rango más amplio de objetivos de un SGC y no tiene por objeto ser utilizada con fines contractuales o de certificación, sino servir de guía para aquellas organizaciones que deseen ir más allá de los requisitos de ISO 9001, persiguiendo la mejora continua del desempeño y la eficiencia globales de la organización. El gráfico anterior ilustra la relación entre estas dos normas.

Para obtener la certificación (a veces llamada registro de organización) la organización debe someterse a una auditoría. Existen tres tipos de auditorías. Las auditorías de primera parte son realizadas con fines internos por la organización, o en su nombre. Las auditorías de segunda parte son realizadas por los clientes de una organización o por otras personas en nombre del cliente. Las auditorías de tercera parte son realizadas por organizaciones externas independientes, usualmente acreditadas (ENAC es el organismo de acreditación español), que proporcionan la certificación o registro de conformidad con los requisitos contenidos en normas tales como la ISO 9001 o la ISO 14001 (Sistema de Gestión de la Calidad según ISO 9001:2000, 2005).

Aunque se ha alineado con ISO 14001:1996, con la finalidad de aumentar la compatibilidad de las dos normas, ISO 9001 no incluye requisitos específicos de otros sistemas de gestión, tales como aquellos particulares para la gestión medioambiental, gestión de la seguridad, gestión financiera o gestión de riesgos.

6.2. CONCEPTOS BÁSICOS UTILIZADOS POR ISO 9000:2000

Se entiende por gestión de la calidad el conjunto de actividades coordinadas para dirigir y controlar una organización en lo relativo a la calidad. Generalmente incluye el establecimiento de la política de la calidad y los objetivos de la calidad, así como la planificación, el control, el aseguramiento y la mejora de la calidad.

Política de la calidad es la expresión formal por la Dirección de las intenciones globales y orientación de una organización relativa a la calidad. Lo que se ambiciona o pretende en relación con la calidad son los objetivos de la calidad. La política de la calidad y los objetivos de la calidad determinan los resultados deseados y ayudan a la organización a aplicar sus recursos para alcanzar dichos resultados. El logro de los objetivos de la calidad puede tener un impacto positivo sobre la calidad del producto/servicio, la eficacia operativa y el desempeño financiero y, en consecuencia, sobre la satisfacción y confianza de las partes interesadas (Sistema de Gestión de la Calidad según ISO 9001:2000, 2005).

Dirección es la persona o grupo de personas que dirigen y controlan al más alto nivel de una organización. Cliente es la organización o persona que recibe un producto/servicio.

Proveedor es la organización o persona que proporciona un producto/servicio. Tanto los proveedores como los clientes pueden ser internos o externos a la organización. Parte interesada es cualquier persona o grupo que tenga un interés en el desempeño o éxito de una organización (clientes, propietarios, bancos, sindicatos, proveedores, socios,...).

La norma utiliza la expresión producto para designar el resultado de un proceso. ISO 9000 considera cuatro categorías genéricas de productos: servicios (transporte) software (aplicaciones informáticas, información) hardware (partes mecánicas, elementos tangibles).

Los servicios, generalmente, son intangibles y su prestación puede implicar, por ejemplo:

- Una actividad realizada sobre un producto tangible suministrado por el cliente (almacenaje, reparación de vehículo)
- Una actividad realizada sobre un producto intangible suministrado por el cliente (declaración necesaria para la devolución de impuestos)
- La entrega de un producto intangible (información)
- La creación de un ambiente para el cliente (salas de espera para viajeros)

Definir la calidad de un servicio resulta más subjetivo e impreciso que definir la calidad de un producto. El producto tangible existe antes de entregarlo al cliente y se puede inspeccionar y medir sus variables, mientras que el servicio se produce y entrega en el mismo acto, por lo que debe prestarse con la calidad requerida sin posibilidad de sustitución. Como la belleza, la calidad de un servicio “*depende del color del cristal con el que se mira*” (Sistema de Gestión de la Calidad según ISO 9001:2000, 2005).

Los clientes necesitan productos/servicios con características que satisfagan sus necesidades y expectativas. Estas necesidades y expectativas se expresan en la especificación del producto/servicio y son generalmente denominadas como requisitos del cliente.

Los requisitos son las necesidades o expectativas establecidas por las partes interesadas, las obligatorias o las que se consideran implícitas por hábito o práctica común para la organización, sus clientes o partes interesadas. La satisfacción del cliente depende de la percepción de éste sobre el grado en que se han cumplido sus requisitos.

Los requisitos para los productos/servicios y, en algunos casos, los procesos asociados pueden estar contenidos en, por ejemplo: especificaciones técnicas, normas de producto/servicio, normas de proceso, acuerdos contractuales y requisitos reglamentarios. En cualquier caso, es finalmente el cliente quien determina la aceptabilidad del producto/servicio.

ISO 9000 define eficacia como la extensión en la que se realizan las actividades planificadas y se alcanzan los resultados planificados y reserva el concepto de eficiencia para la relación entre el resultado alcanzado y los recursos utilizados. Dado que las necesidades y expectativas de los clientes son crecientes y debido a las presiones competitivas y a los avances técnicos, las organizaciones deben mejorar continuamente sus productos/servicios y los procesos para producirlos.

Para ISO 9000, proceso es un conjunto de actividades mutuamente relacionadas o que interactúan, las cuales transforman elementos de entrada en resultados con un valor añadido (expresa lo que hay que hacer y para quién). En cambio, el procedimiento es la forma especificada por la organización para llevar a cabo una actividad o un proceso (determina cómo hay que hacerlo). Puede estar documentado o no.

El SGC (sistema de gestión de la calidad) es aquella parte del sistema de gestión enfocada a dirigir y controlar una organización en relación con la calidad. Un enfoque para desarrollar e implementar un SGC (o para mantener y mejorar uno ya existente) comprende diferentes etapas tales como:

- Determinar las necesidades y expectativas de los clientes y de otras partes Interesadas.
- Establecer la política y objetivos de la calidad de la organización;
- Determinar procesos y responsabilidades necesarias para lograr los objetivos de la calidad.

- Determinar y proporcionar los recursos necesarios para lograr los objetivos de la
- Calidad.
- Establecer los métodos para medir la eficacia y eficiencia de cada proceso.
- Aplicar estas medidas para determinar la eficacia y eficiencia de cada proceso.
- Determinar los medios para prevenir no conformidades y eliminar sus causas.

6.3. LA ESTRUCTURA DE ISO 9001:2000

ISO 9001 especifica los requisitos para un SGC, cuando una organización: Necesita demostrar su capacidad para prestar de forma coherente servicios que satisfagan los requisitos del cliente y los reglamentarios aplicables, y aspira a aumentar la satisfacción del cliente a través de la aplicación eficaz del sistema, incluidos los procesos para la mejora continua del sistema y el aseguramiento de la conformidad con los requisitos del cliente y los reglamentarios aplicables.

Todos los requisitos de ISO 9001 son genéricos y se pretende que sean aplicables a todas las organizaciones sin importar su tipo, tamaño y producto suministrado. Sólo permite exclusiones de requisitos del capítulo 7 (“Prestación del servicio”) que no resulten aplicables, debido a la naturaleza de la organización y de su servicio, si tales exclusiones no afectan a la capacidad o responsabilidad de la organización para proporcionar servicios que cumplan con los requisitos del cliente y los reglamentarios aplicables.

En relación con los procesos, ISO 9001:2000 establece que la organización debe:

- Identificar y concretar cómo se ordenan y se interrelacionan los procesos necesarios para el SGC.
- Determinar los criterios y métodos necesarios para asegurarse de que la operación y el control de estos procesos sean eficaces,
- Asegurarse de la disponibilidad de recursos e información necesarios para apoyar la operación y el seguimiento de los procesos,
- Realizar el seguimiento, la medición y el análisis de estos procesos, e
- Implementar las acciones necesarias para lograr los resultados planificados y la mejora continua de estos procesos.

Para cumplir con estos requisitos, deberemos cerciorarnos de que las actividades correspondientes han sido incorporadas al SGC. Además, es recomendable que los procesos del SGC estén definidos documentalmente (por ejemplo diagrama de flujo, ficha de proceso, etc.) y tener métodos apropiados (por ejemplo indicadores) que permitan hacer su seguimiento y medición.

Debería entenderse que el SGC ha de incluir como mínimo los procesos de prestación de los servicios de Transporte contemplados en el capítulo 7 de ISO 9001:2000 (salvo las exclusiones permitidas):

- Proceso de planificación.
- Proceso relacionado con el cliente.
- Proceso de diseño y desarrollo.
- Proceso de compras.
- Proceso de prestación del servicio.
- Proceso de control de los dispositivos de seguimiento y medición.

También es conveniente identificar otros procesos como, por ejemplo:

- Revisión por la Dirección.
- Auditorías internas.
- Acción correctiva y preventiva.
- Seguimiento de la satisfacción del cliente.
- Análisis de datos, etc.

6.3.1. REQUISITOS DE LA DOCUMENTACIÓN

La documentación permite la comunicación del propósito y la coherencia de la acción. Su utilización contribuye a lograr la conformidad con los requisitos del cliente, a proveer la formación apropiada sobre el SGC, a hacer posible la repetibilidad y la trazabilidad, a proporcionar evidencias objetivas y a evaluar la eficacia y la adecuación continua del SGC. Puede estar en cualquier formato o tipo de soporte y su extensión depende de cada

organización, según su tamaño, complejidad de los procesos e interacciones, competencia del personal, etc (Sistema de Gestión de la Calidad según ISO 9001:2000, 2005).

El control de los documentos (internos y externos) consiste básicamente en asegurarse de que los documentos que se encuentran en uso son adecuados y aprobados. Es necesario que este procedimiento documentado describa cómo se ejerce el control de los documentos. Es aconsejable evitar medidas complejas de actualización y recuperación.

La norma exige que la información esté al día, pero no especifica cómo ha de hacerse. Aprovechando la flexibilidad que permite este apartado, es aconsejable adoptar los métodos más sencillos y prácticos para evitar burocracia y costos innecesarios.

Antes de ser emitidos, los documentos deberían ser revisados y aprobados por la persona apropiada para comprobar que sean idóneos para el fin que persiguen. Lo mismo ha de ocurrir con los cambios que sufran los documentos controlados.

Se debe precisar durante cuánto tiempo será necesario conservar cada tipo de registros, dónde se ubicarán y cómo deshacerse de ellos. En algunos casos, el periodo de conservación viene determinado por requisitos legales o reglamentarios, por requisitos financieros, por posibles demandas de responsabilidad civil o por especificaciones de los clientes.

El archivo de los registros puede realizarse en cualquier formato que sea apropiado (por ejemplo, en copia impresa o electrónica). El almacenamiento tendrá que ser el adecuado para el soporte y debería ser tal que el riesgo de deterioro, desperfecto o pérdida se redujese al mínimo. Resulta útil decidir quién tiene acceso a los registros y con qué facilidad ha de ser posible disponer de éstos (Sistema de Gestión de la Calidad según ISO 9001:2000, 2005)

6.4. Programa de garantía de la calidad

6.4.1. Principios generales

- El programa de GC deberá abarcar todos los aspectos de las actividades del laboratorio que pueden influir en la calidad de su producción.

- No existe ningún programa "universal" de GC, adecuado para todos los laboratorios. La importancia concedida a cada uno de los aspectos de la GC será indicativa del trabajo y los objetivos del laboratorio.
- Si se pretende que el personal aplique un programa de GC, es necesario que participe en su elaboración.

6.4.2. Definición y ámbito de aplicación

El programa de garantía de la calidad -también denominado en ocasiones "sistema de calidad"- puede definirse como un mecanismo destinado a garantizar que los datos producidos por un laboratorio sean de la máxima calidad. Como se explicó anteriormente, la "máxima calidad" no tiene por qué estar relacionada con la superioridad analítica y la complejidad técnica, con un equipo que incorpore los últimos adelantos o con una exactitud, precisión o límites de detección extraordinarios; significa tan sólo que los datos son plenamente fiables e idóneos para el fin al que están destinados, que se presentan oportunamente y que tienen un costo aceptable. La garantía de haber conseguido esa calidad se basa en la confianza en que todas las operaciones del laboratorio se llevan a cabo del modo previsto, y que, si hace falta, existe la documentación necesaria para llevar a cabo una nueva evaluación (FAO, 1989).

El ámbito de aplicación del sistema de garantía de la calidad ha de determinarse de modo que, cuando se notifiquen nuevos datos, pueda confiarse en que:

- No se han puesto en peligro la identidad e integridad de la muestra.
- El análisis ha sido realizado por un miembro del personal capacitado para realizar esta tarea.
- El equipo y los métodos utilizados son adecuados y funcionan correctamente.
- El laboratorio puede demostrar su capacidad para producir datos válidos de ese tipo.

La fórmula adoptada para cumplir estos requisitos básicos puede y debe variar de un laboratorio a otro. Cada laboratorio (o grupo de laboratorios) cumple requisitos diferentes, está sometido a condiciones de organización diferentes, se enfrenta a limitaciones diferentes y ha de tener un programa de gestión de calidad (GC) que tenga

en cuenta estos factores. No existe un programa de GC universalmente adecuado, pero en la práctica muchos programas tienen ciertos elementos fundamentales en común, como por ejemplo: la aplicación de métodos validados; el uso de procedimientos operativos estándar (POE) en el laboratorio; la calibración y trazabilidad de las mediciones (incluido el uso de materiales de referencia certificados, cuando pueden conseguirse); la evaluación externa del rendimiento (FAO, 1989).

6.4.3. Preparación

El programa de GC abarca pues un ámbito mucho más amplio que el proceso de análisis, por importante que éste sea. Comprende todo lo que sucede en el laboratorio que puede influir en la "calidad" de los datos. El corolario de esto es que la garantía de la calidad afecta a todos los que trabajan en el laboratorio; si desempeñan un papel en el funcionamiento del laboratorio, el programa de garantía de la calidad se refiere también a lo que hacen, y a si lo hacen correctamente. Todo miembro del personal debe

- Tener claro lo que se espera que haga.
- Saber cómo hacerlo.
- Poder demostrar que lo ha hecho correctamente.

La documentación es pues uno de los aspectos principales de un programa de GC: cada miembro del personal que ha realizado un determinado trabajo debe poder demostrar que había recibido la capacitación necesaria, que el equipo y los materiales que ha utilizado estaban en buen estado, que el método aplicado era apropiado para el fin al que estaba destinado y ha producido resultados fiables y que se han seguido unos procedimientos operativos estándar. Es importante que todos los miembros del personal participen de algún modo en la preparación de la documentación que afecta a su propio trabajo.

El programa de GC afecta a todo el personal, y por consiguiente, para que tenga éxito cada uno de sus miembros ha de sentirse partícipe en el diseño del programa, ha de comprender por qué se ha introducido y ha de empeñarse en llevarlo a buen término (FAO, 1989).

6.5. Sistema de Gestión de la Calidad en Laboratorios Clínicos ISO 15189

La norma ISO 15189:2012 contiene todos los requisitos que los LABORATORIOS CLÍNICOS QUE ANALIZAN MUESTRAS BIOLÓGICAS DE ORIGEN HUMANO, tienen que cumplir para demostrar que (Sánchez L., 2016):

- Disponen de un sistema de gestión de la calidad.
- Son técnicamente competentes.
- Son capaces de producir resultados técnicamente válidos.

ISO 15189 fue elaborada por el Comité Técnico ISO/TC 212 (Clinical Laboratory Testing and In Vitro Diagnostic Systems) tomando como referencia las normas ISO / IEC 17025 e ISO 9001.

Se divide en dos partes, la parte de gestión correspondiente a los requisitos para la certificación del sistema de calidad y la parte técnica que describe los requisitos para el personal, instalaciones, equipos, procedimientos, garantía de calidad e informes. Es en esta última parte donde más se diferencia de la Norma en la que se basa, la Norma ISO 9001:2008.

La Norma además tiene dos anexos a nivel informativo, uno referente a las recomendaciones para la protección de los sistemas de información del laboratorio y otro sobre la ética en el laboratorio clínico. Esta norma acredita y demuestra de manera objetiva e independiente el compromiso de un laboratorio con la calidad y con la competencia técnica. Se demuestra así, una garantía sobre el funcionamiento del laboratorio, un control sobre sus procesos, así como capacidad para satisfacer los requisitos técnicos necesarios para asegurar una información vital para el diagnóstico clínico. (Sánchez L., 2016).

6.5.1. Principales requisitos

- Personal cualificado, imprescindible para un servicio de calidad.

- Equipos de laboratorio, reactivos y material fungible, insumos críticos para la realización del trabajo diario en un laboratorio, luego su gestión es clave para la optimización de procesos y obtención de la máxima calidad en el servicio ofrecido.
- Control sobre los procesos clave de un laboratorio clínico: procesos pre analíticos, analíticos y pos analíticos.
- El pensamiento basado en el riesgo, como un elemento dinamizador del enfoque a procesos.
- Adecuada gestión y notificación de información sensible para los pacientes.
- Comunicación de valores críticos para asegurar la seguridad del paciente.

6.5.2. Ventajas para la organización

- Reducción de riesgos, pues permite al laboratorio determinar si está realizando su trabajo correctamente.
- Compromiso de todo el personal del laboratorio con el cumplimiento de los requisitos de los clientes/pacientes.
- Las evaluaciones periódicas del organismo de acreditación le proporcionan un punto de referencia para mantener la competencia con otros laboratorios clínicos.
- Mejora continua del sistema de gestión del laboratorio.
- Desarrollo continuo de las competencias del personal a través de planes de formación y de la evaluación de la eficacia de los mismos.
- Mejora de la imagen e incremento de la confianza y satisfacción de los clientes/pacientes.
- Acceso a Administraciones Públicas, debido al reconocimiento contrastado y acreditado.
- Incremento de la productividad y eficacia del laboratorio.

6.5.3. Ventajas para los clientes

Las ventajas de una gestión correcta de todos los procesos del Laboratorio Clínico, además de repercutir positivamente en el propio Laboratorio, tiene consecuencias positivas en:

- La prestación y optimización de otros servicios sanitarios, ya que se conseguirían evitar ingresos innecesarios.
- Se agiliza el proceso de las altas médicas y en general mejoraría la asistencia primaria y hospitalaria.
- Enfatiza el servicio total del laboratorio clínico: asesoramiento clínico, tiempo de espera, costo etc.
- Mayor enfoque en seguridad del paciente e informe de resultados.
- Se consideran las necesidades éticas y de información (comunicación) de los laboratorios clínicos al paciente. (Advisors, 2012)

6.6. Muestras secas en tubo (MST):

Una solución simple y costo-eficaz para los programas de pruebas de competencia para controlar y mejorar la calidad de las pruebas en los países apoyados por el PEPFAR.

- En los países apoyados por el PEPFAR se llevarán a cabo millones de pruebas rápidas del VIH.
- Miles de centros de pruebas, varios miles de personas procesando pruebas rápidas (sin ser personal del laboratorio).
- Garantizar la calidad de las pruebas rápidas del VIH continúa siendo un gran desafío
- Hasta ahora los principales avances son:
 - Capacitación
 - La EEC usando repetición de pruebas (10 % de DBS recogidas en los centros de pruebas)

Método de PC alternativo: Introducción a la técnica de muestras secas en tubo (MST)

La técnica de «muestras secas en tubo» (o «dried tube specimens»), un nuevo concepto en el laboratorio del CDC, ofrece una alternativa práctica para el programa de PC Una idea simple y brillante - Chin-Yih Ou! porque las pruebas de detección del VIH se han expandido rápidamente en todo el mundo, pero los programas de pruebas de aptitud (PT)

para supervisar y mejorar la calidad de las pruebas a menudo carecen de escenarios con recursos limitados (RLS). Los programas PT tradicionales y los reactivos de control de calidad utilizan muestras de suero o plasma que requieren condiciones rigurosas para el almacenamiento y el transporte. La idea brillante de Chin-Yih Ou fue desarrollar un enfoque novedoso, sencillo y fácil de usar, basado en muestra seca en tubo (MST), que permitiera ayudar a monitorear la calidad de la prueba de anticuerpos del VIH en escenarios con recursos limitados. El programa PT basado en MST fue probado con éxito en 24 sitios de pruebas en Kenia. Los resultados demuestran que la MST es un método práctico simple de usar para preparar y distribuir paneles PT y muestras de control de calidad para monitorear las prácticas de prueba del VIH en lugares con recursos limitados (Bharat S. Parekha, 2010).

6.6.1. Promover un sistema nacional de calidad para el diagnóstico de dengue implicara:

Designación de un gerente nacional de calidad, que de hecho ya existe y funciona en el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia, además debe implementarse el sistema de gestión de la calidad integrado por: Bioanalistas, Microbiólogos, oficiales de la calidad y auditores.

Extender la aplicabilidad del sistema de calidad utilizando la muestra seca en tubo involucrando a toda la red de laboratorios que procesan muestras para el diagnóstico de dengue en el país.

La formación y la constante capacitación del personal que procese los paneles de proficiencia usando muestra seca en tubo deberán incluir:

- Introducción a buenas prácticas de laboratorio.
- Conocimiento y aplicación correcta de las prácticas de bioseguridad.
- Dominio de la técnica para procesar paneles de proficiencia que contienen muestra seca en tubo.
- Apego estricto a las instrucciones establecidas en el instructivo que acompaña el panel de MST.
- Manejo adecuado de la documentación que incluye; Procedimientos operativos estándar, protocolos de trabajo, y formato de reporte de los resultados.

- Desarrollo óptimo de las fases; pre analítica, analítica y post analítica.
- Procesar el panel en el tiempo indicado y reportar los resultados en tiempo y forma.
- Exigir al CNDR el informe de los resultados obtenidos.
- Buena comunicación y relaciones interpersonales con los clientes internos y externos.
- Disponibilidad para la solución de problemas.
- Evaluación periódica de las competencias del personal que procesa los paneles de MST para dengue.
- Supervisión sistemática de procesos y de documentación utilizada en la red diagnóstica de dengue.

6.7. Controles internos

El proceso de control se refiere al control de las actividades empleadas en el manejo y análisis de las muestras, con el fin de asegurar resultados precisos y fiables. Se clasifica en tres etapas (Mineco, 2012):

- Fase pre analítica – Manejo de muestras
- Fase analítica – Controles de calidad
- Fase pos analítica – Revisión de resultados

Control de calidad consiste en análisis de sustancias con parámetros conocidos (material de control) junto con las muestras de pacientes, para supervisar la exactitud y la precisión del método realizado. El propósito fundamental es detectar y corregir errores debido a fallos en el equipo, condiciones ambientales o mal desempeño del operador, antes de reportar los resultados a los pacientes (Handbook, 2011)

6.7.1. Tipos de controles internos

Control de Calidad Internos (CCI, CC, QC o IQC)

Para pruebas cuantitativas: miden la cantidad de una sustancia particular en la muestra, por ejemplo en; química clínica, Hematología, hormonas, algunos ELISA, además en determinación de carga viral y conteo de CD4. Los controles de calidad para pruebas cuantitativas están diseñados para asegurar que los resultados del paciente son exactos y precisos.

Los pasos para la implementación son los siguientes: Establecer políticas y procedimientos, asignar responsabilidades, seleccionar controles de alta calidad, establecer rangos de control, desarrollar graficas de Levy-Jennings, monitorear resultados (reglas de Westgard), desarrollar procedimientos para acciones correctivas y registrar todas las acciones tomadas. Los factores a tomar en cuenta cuando se van a procesar controles cuantitativos internos: dar el mismo tratamiento que a las muestras, correr siempre después de calibración de equipos o cambios en el método, establecer rutina de corridas (diario vs semanal) y no usar calibradores como controles (Handbook, 2011).

Las características de los materiales de control para pruebas cuantitativas:

Deben cubrir los valores de decisión médica, matriz similar a la muestra, Ideales en gran cantidad, idealmente suficiente para 1 año, se pueden almacenar en alícuotas. Pueden ser obtenidos; comercialmente, a través de muestras conocidas u obtenidos de otro laboratorio de referencia.

Para pruebas cualitativas y semi-cuantitativas: Miden la presencia o ausencia de cierta característica, produciendo un resultado no numérico como por ejemplo; Observaciones microscópicas, detección de Ac o Ag y procedimientos microbiológicos.

Tipos de controles cualitativas y semi-cuantitativas: Controles incorporados en el dispositivo, controles que mimetizan muestras (tradicionales) y cepas referencia (Handbook, 2011).

- **Los controles Incorporados** vienen integrados en el dispositivo de la prueba, son realizados automáticamente cuando se realiza cada determinación, la ausencia de banda o punto invalidan el resultado y la presencia de banda asegura que el procedimiento se realizó correctamente. Estos controles incorporados aseguran ciertos aspectos del desempeño de la prueba tales como; Integridad de la membrana de nitrocelulosa, volumen y tipo de muestra, almacenamiento correcto, vencimiento de las pruebas. La mayoría no evalúan el proceso entero porque no evalúan; sensibilidad analítica y diagnóstica, especificidad analítica y diagnóstica, y la confusión de muestras.
- **Los controles tradicionales:** son materiales con reactividad conocida, mimetizan muestra de paciente, aseguran la integridad de toda la prueba. Siempre es

recomendable usar control negativo y positivo de preferencia incluir controles con resultado levemente positivo (cercanos al cut-off).

Elementos de un programa de control de calidad

Independientemente del tipo de análisis realizado, los pasos para implementación y mantenimiento de un programa de control de calidad incluyen: Establecer políticas y procedimientos escritos que incluyan acciones correctivas, capacitación continua, documentación completa y análisis de resultados de control de calidad.

6.8. Evaluación externa de la calidad

Los objetivos de un programa de evaluación externa de la calidad consisten en: conocer los diferentes tipos de evaluación externa, presentar la muestra seca en tubo (MST) como una alternativa al Programa de evaluación externa de la calidad (PEEC), revisar los distintos análisis que pueden hacerse cuando se implementa un PEEC y consensuar el rol de los encargados del programa de evaluación externa de la calidad de los laboratorios que serán evaluados periódicamente (Handbook, 2011).

La evaluación externa de la calidad (EEC) describe métodos que permiten la comparación de pruebas de laboratorio por una fuente externa a este, puede implementarse y desarrollarse de las siguientes maneras: evaluación en el sitio o supervisión directa, re-análisis, intercambio de muestras y utilizando paneles de competencia/proficiencia.

La EEC permite la comparación del desempeño y los resultados entre diferentes sitios, provee alertas tempranas sobre errores sistemáticos asociados al kit o a los procedimientos, indica áreas que necesitan mejora e identifica necesidades de capacitación.

La evaluación externa de la calidad se puede implementar de las siguientes formas (Handbook, 2011):

- **Supervisión directa:** en el que un equipo del laboratorio evaluador visita periódicamente al laboratorio evaluado. Permite obtener una mejor imagen de las prácticas de laboratorio, y debe ser capacitante, además requiere de una sistematización, movilización y recursos humanos.

- **EEC – RE-analysis:** El laboratorio evaluado envía a un porcentaje de sus muestras al laboratorio evaluador, 10 % negativas y 100 % positivas o envío por lotes según % de positividad. Comúnmente usado en microscopía, implica costo, tiempo y solo evalúa el resultado final, pero no evalúa el proceso.
- **EEC - Intercambio de muestras:** Normalmente se reserva para análisis especializados para los que no se dispone de ensayo de aptitud analítica. Este método lo utilizan laboratorios muy especializados o sofisticados, por ejemplo donde se realiza medición de plaguicidas, análisis fisicoquímicos de aguas, alimentos e industria farmacéutica.
- **EEC – Paneles de competencia:** Un proveedor externo envía muestras desconocidas para su análisis a un grupo de laboratorios, y los resultados son analizados, comparados y enviados a estos. Posee varias ventajas entre las que se pueden mencionar: tiempo menor vs Re-análisis, se puede diseñar de tal modo que evalúe varias etapas del proceso, diferentes metodologías o sea pueden utilizarse o prepararse con diferentes tipos de muestras tales como: sueros, muestra seca en papel filtro (DBS) y muestra seca en tubo (MST). La muestra seca en tubo es una modalidad que diseño CDC para el control externo de la calidad en pruebas rápidas de VIH y está siendo probado con otros analitos.

El panel se utiliza para evaluar como realiza el laboratorio las pruebas de los pacientes, por tanto no deben tratarse de manera diferente a cualquier otra muestra analizada y se debe procesar junto con otras muestras que se le harán las pruebas sin darle atención especial (Handbook, 2011).

La muestra seca en tubo (MST) es un concepto desarrollado en el centro para el control y prevención de enfermedades (CDC), para ofrecer una alternativa práctica para el programa de pruebas de aptitudes (PT).

La preparación de estos la MST requiere la utilización de muestras que sean verdaderamente positivas y negativas, pueden usarse muestras provenientes de bancos de sangre o muestras recolectadas de pacientes con resultados conocidos (ética).

6.8.1. Caracterización de las muestras para paneles de MST

- Se debe correr todas las pruebas de VIH disponibles para asegurar que las muestras son verdaderas positivas y negativas.
- De preferencia, utilizar muestras altamente positivas para producir paneles.
- Las muestras que dan origen a los paneles, solo deben ser caracterizadas una vez, pudiéndose guardar alícuotas para futuras rondas sin necesidad de volver a caracterizar.
- Documentación recomendada a ser utilizada en los paneles de MST
- Certificado de inscripción en Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) (solo una vez)
- Caracterización de muestras
- Cronograma de Rondas
- Instrucciones de reconstitución
- Registro de resultados
- Retro-alimentación
- Certificado de aprobación (por ronda)

Ventajas de la muestra seca en tubo (MST)

- Fáciles de preparar
- Estables a temperatura ambiente
- Considerados como material NO infeccioso (transporte)
- Relativo bajo costo.
- Puede ser usado también como C.C.
- Relativa facilidad de descentralización

Implementación del programa de EEC utilizando MST

- Capacitación a todos los profesionales de laboratorio que realizan las pruebas diagnósticas

- Distribución periódica de los paneles PT, está recomendado realizar al menos 2 rondas por año
- Reporte de los resultados del PT (Máximo una semana)
- Reporte de retroalimentación a los sitios de prueba en un periodo de tiempo determinado (No más de 15 días)
- Implementación de acciones correctivas en los sitios de prueba con resultados de los paneles de PT insatisfactorios (ejemplo, llamadas telefónicas, visita al sitio/re-capacitación, email)
- Taller de 1 día al año para diseminación

7. Diseño Metodológico

Tipo de estudio:

Descriptivo de corte transversal.

Área de estudio:

Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia.

Universo y muestra.

Universo: muestras recibidas, procedentes de los diferentes SILAIS que procesan muestras para el diagnóstico de dengue y que envían muestras para control de calidad al Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia. La seroteca de estas muestras almacenadas en el CNDR es menor a 10,000 ya que solamente se almacenan las positivas y en determinados periodos se descartan las muestras negativas. Para el propósito de elaboración de los pool de muestras negativas y positivas se hizo una selección aleatoria por conveniencia, donde se incluyeron 220 muestras negativas y 326 muestras positivas. Se incluyeron la cantidad de muestras negativas y positivas tomando en cuenta los valores de densidad óptica que evidenciaran que las muestras fueran verdaderas positiva y negativas.

Según el procedimiento para la elaboración de los paneles de proficiencia usando muestra seca en tubo no establece incluir para cada pool una determinada cantidad de muestras. Esto implica que se puede optar por incluir desde 5 a más muestras, lo que si debe tomarse en cuenta es que dichas muestras estén libres de determinados analitos que puedan generar una reactividad cruzada. A las muestras seleccionadas para elaborar los pool se les proceso: VIH, hepatitis A, B y C, Sífilis, leptospira y aunque cuando estas muestras ingresaron al CNDR no había aun presencia de Chikungunya y Zika, pero se les hicieron estas pruebas. Los resultados de todas estas pruebas para los pool fueron negativos.

Por lo antes mencionado se trata de demostrar que para la elaboración de los paneles de proficiencia, no es necesario calcular la muestra aplicando la fórmula para universo de muestras menor o mayor a 10,000 según corresponda. A pesar de ello se trató de preparar los pool incluyendo una cantidad de muestras elevada. Finalmente se preparó un pool de

muestras negativas conteniendo 130 ml. Y el pool de muestras positivas tuvo un volumen de 139 ml.

Tipo de muestreo

No probabilístico por conveniencia.

Criterios de Inclusión

Fase pre analítica

- Muestras de la seroteca de serología de dengue y que ingresaron al CNDR como parte de control de calidad procedentes de los diferentes SILAIS del país.
- Cantidad de espécimen suficiente, equivalente a 1 ml o más.
- Muestras libres de fibrina y de hemolisis.
- Muestras preservadas de 4 – 8 °C
- Muestras procesadas por ELISA de captura de IgM de dengue.
- Que cada una de las muestras incluidas estén registradas en base de datos con su respectivo resultado.
- Muestras positivas con lecturas de absorbancias mayores a 1.00
- Muestras negativas con lecturas de absorbancias entre 0.05 y 0.1

Fase analítica

- Atemperar muestras y reactivos antes de realizar el procedimiento.
- Utilizar el mismo reactivo para ELISA de captura de IgM que se utilizó para procesar las muestras seleccionadas.
- Al momento de procesar las muestras seguir las instrucciones del procedimiento operativo estándar de ELISA de captura de IgM, del área de serología de dengue.
- Verificar que los casos metálicos que se utilizan como cámara húmeda estén hidratados.
- Verificar que la temperatura de la incubadora este a 37°C.
- Elaborar protocolo de trabajo antes de cada corrida de muestras.
- Considerar los criterios de validación de la técnica para emitir resultado.
- Aplicar buenas prácticas de laboratorio y respetar las medidas de bioseguridad.

Criterios de exclusión

- Cantidad insuficiente de muestra.
- Muestras hemolizadas o que contengan fibrina.
- Especímenes que no se preservaron según temperaturas establecidas (4 – 8 °C).
- Muestras que no hayan sido analizadas previamente por serología de dengue.

Método e instrumento de recolección

1. Materiales y Equipos

- Gradillas
- Cronometro
- Descartes
- Tira de microelisa de poliestireno fondo plano
- Lector de ELISA
- Pipetas automáticas de 0.5 a 10 µl
- Pipetas automáticas multicanal de 50 a 300 µl
- Pipeta automática de 10 a 100 µl
- Pipeta automática de 5 a 50 µl
- Incubadora de 37°C
- Marcadores de punta fina
- Puntas de 1 a 200 µl
- Puntas 0.5 a 10 µl
- Puntas de 200 a 1000 µl
- Tubos cónicos de 15 mL
- Viales de 1.5mL
- Crioviales fondo cónico de 1.5 µl
- Vortex
- Probetas de 100 mL
- Cabina de Bioseguridad clase 2
- Refrigeradora de 4 – 8°C
- Frasco con filtro de 1000 ml
- Bomba de vacío

- Protocolos de trabajo
 - Papel absorbente
 - Impresora
 - Papel bond tamaño carta
2. Reactivos
- Inmunoglobulinas de carnero Anti-IgM humano
 - Antígeno del virus del Dengue (Den 1, Den 2, Den 3 y Den 4)
 - Inmunoglobulina Anti-VD acopladas a la enzima peroxidasa de rábano.
 - Tetrametil bencidina (TMB)
 - Buffer carbonato-bicarbonato con pH 9.6
 - Solución fosfato salina al 0.05 %
 - Suero Bovino
 - Buffer fosfato salina (PBS) pH 7.4
 - Tween 20
 - Suero control positivo alto
 - Suero control positivo bajo
 - Suero control negativo
 - Agua destilada
 - Ácido Sulfúrico 12.5%
 - Colorante Green Dai
 - Buffer fosfato salino con Tween 20, pH 7.4 marca SIGMA.

Método

1. Pasos de la técnica de MST
 - PLAN (Costo, suministros, personal, capacitación)
 - Recursos
 - 1..1. Infraestructura de laboratorio
 - Adquisición de las muestras
 - 1..1. Adquisición de las muestras y Caracterización del mayor número de las mismas (use tantas pruebas como sea posible para asegurar un panel a prueba de fallos)
 - 1..2. Preparación de la MST

- Empaquete
- Envíe las muestras a los centros
- Revisión de los resultados

2. Preparación e hidratación de la muestra seca en tubo.

Consiste en caracterizar muestras positivas y negativas, de las muestras negativas y positivas se procede a hacer pool de muestras negativas y positivas, a los pool se les agrega colorante Green dai al 0.01%. Posteriormente se colocan 20 μ l de pool (positivos o negativos) en crioviales de fondo cónico y se dejan destapados durante toda la noche preferiblemente en una cabina de bioseguridad. Al día siguiente se verifica que la muestra este seca y que el pellet sea observable en el fondo del vial, usando una pipeta Pasteur de plástico añadir 7 gotas de amortiguador a cada tubo (cada gota contiene 30 μ l) si se cuenta con pipetas automáticas se colocan 200 μ l del buffer fosfato salino. Dejar los tubos en posición vertical a temperatura ambiente durante la noche. Al día siguiente, dé unos golpecillos en los viales, mezcle y realice las pruebas siguiendo el procedimiento operativo estándar para el diagnóstico serológico de dengue el cual consiste en el método de captura de IgM de dengue. Aplicando todas las medidas de bioseguridad establecidas y las buenas prácticas de laboratorio.

Para los estudios de estabilidad, múltiples conjuntos de muestras secas en tubo se prepararon utilizando un "panel de 4 miembros" (2 positivos y 2 negativos a dengue) y se almacenó a 4 – 8 °C, 37° y a temperatura ambiente. Para evaluar la estabilidad de la muestra seca en tubo, un conjunto a cada temperatura diferente se rehidrata en las semanas 1, 2, 3 y 4, pero en este estudio se rehidrato a los 10, 20 y 30 días después de preparada la MST.

La estabilidad de las muestras a las tres diferentes temperaturas y en tiempos diferentes se evaluó observando las densidades ópticas obtenidas en cada lectura y en cada una de las muestras sujetas a estudio. Las muestras que mantuvieron valores de densidad óptica cercanos o similares a los pool de muestra fresca original son las que se consideraron con mayor estabilidad.

3. Determinación de anticuerpos IgM-dengue por ELISA de Captura

- Las tiras de poliestireno son sensibilizadas con Anti IgM humana producidas en carnero a una concentración proteica de 6.6ug/mL o 66 µl/10mL. Se adicionan 100ul por pozos.
- Incubar a temperatura ambiente durante toda la noche.
- Lavar 3 veces con PBS mas tween 20 al 0.05% (PBS-T) con 280 µl por pozos.
- Secar la placa
- Bloquear con BSA al 4%. Agregar 150 µl a cada pozo e incubar 1 hora a 37°C.
- Descartar el BSA, secar la placa a 37°C por hora y media si esas no se utilizaran inmediatamente.
- Adicionar las muestras de suero y los controles diluidos 1/20 en PBS-T 0.1% en un volumen total de 50 µl por pozos. Utilizar un control positivo bajo, un control positivo alto y un control negativo por triplicado.
- Incubar 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
- Lavar 4 veces con PBS-T 0.1% con 280ul por pozos.
- Adicionar 50ul por pozo de la mezcla de antígeno (celular o de ratón) de los 4 serotipos de Dengue diluidos en PBS-T 0.1%.
- Incubar a 37°C por 60 minutos en cámara húmeda.
- Lavar 4 veces, 280ul por pozo, con PBST (0.1%T)
- Colocar 50 µl por pozo de la solución de conjugado anti-DENGUE Peroxidasa. Preparar previamente según título indicado.
- Incubar 30 minutos a 37°C en cámara húmeda.
- Lavar 5 veces con PBS-T 0.1% 280ul por pozo.
- Adicionar 50ul por pozo del sustrato TMB, listo para usar.
- Incubar de 10 a 15 minutos a temperatura ambiente y protegido por la luz.
- Detener la reacción con 50 µl por pozos de Ácido Sulfúrico.

Realizar la lectura de D.O a 450 nm con una longitud de onda diferencial de 630 nm.

Validez de la prueba: Para considerar valida la prueba realizada se debe cumplir con los siguientes criterios:

- a) Los valores de D.O de los controles negativos deben ser similares entre sí para realizar el cálculo del VC, descartar aquel valor que se aleje del promedio de los mimos.

- b) Para realizar el cálculo del VC deben ser validos al menos dos valores D.O de los controles negativos.
- c) El valor D.O del control positivo Alto debe ser 5 veces más alto que el valor promedio de los D.O de los controles negativos.
- d) El valor D.O del control positivo Bajo debe ser mayor que el VC.

Diseño del instrumento

Para recopilar los datos se utilizó la base de datos de serología de dengue, y lo se hizo fue filtrar los códigos de las muestras negativas y positivas que cumplieran con las densidades ópticas establecidas en los criterios de inclusión (negativas de 0.05 a 0.1 y positivas mayores a 1), con la finalidad de seleccionar las muestras idóneas para la preparación de los pool de muestras caracterizadas positivas y negativas. Para el procesamiento de todas las muestras en los diferentes momentos se utilizaron los protocolos de trabajo normados en el área de serología de dengue del departamento de Virología del Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia además se imprimieron los resultados de cada una de las lecturas las cuales se adjuntaron a sus respectivos protocolos.

Procesamiento y análisis de los datos

El procesamiento de los datos se realizó de forma digitalizada por medio de una computadora; para la elaboración del documento se utilizaron los programas Microsoft Word para los textos, Microsoft Excel para la elaboración de las tablas y gráficas y Microsoft Power point para la elaboración de la presentación visual.

Coordinación

La coordinación del estudio estuvo a cargo de nuestro tutor y responsable de área de serología de VIH del centro nacional de diagnóstico y referencia CNDR-MINSA, MSc. Felipe Torres Meneses quien nos sugirió el tema a desarrollar para la monografía y nos apoyó brindándonos su incondicional apoyo para la elaboración de nuestra monografía.

Recursos humanos

- Estudiantes de la carrera de microbiología que realizan el estudio para su monografía.
- Responsable del área de serología de VIH en el departamento de Virología en el CNDR.
- Analistas del área de serología de dengue y personal encargado de la gestión de la calidad en el CNDR.

Recursos financieros:

Los recursos financieros necesarios para llevar a cabo esta investigación fueron suministrados por el Centro Nacional de Diagnóstico y Referencia del Ministerio de Salud (MINSA) y por el Instituto de Ciencias Sostenibles (SSI).

Variables

- Objetivo 1: Selección de muestras de la seroteca de control de calidad de dengue, Caracterización de las muestras, Elaboración de pool de muestra, Procesamiento de cada uno de los pool, Preparación de la muestra seca en tubo, Procesamiento de la muestra seca en tubo.
- Objetivo 2: Positividad y negatividad a dengue en muestra fresca y en muestra seca en tubo.
- Objetivo 3: Resultados de las muestras secas en tubos a los 10 días, a los 20 días y a los 30 días a tres diferentes temperaturas: a temperatura ambiente, de 2 – 8°C y a 37°C.

Consideraciones éticas: Se abordó y se explicó el tema al Dr. Ángel Balmaceda, director del departamento de Virología en el CNDR. Quien aprobó la realización de este estudio en el departamento de Virología y además lo considero de mucho interés ya que si los

resultados obtenidos eran satisfactorios se procedería a implementar los paneles de proficiencia para el control externo de la calidad en dengue.

Se elaboró una propuesta monográfica donde se explica de forma breve el estudio del tema y se entregó a las autoridades del Instituto Politécnico de la Salud con la finalidad de obtener la aprobación para proceder con la realización del trabajo monográfico.

- La información fue manejada solamente por el investigador.
- Los datos del estudio serán utilizados solo para fines del mismo.
- El director del Departamento de Virología del CNDR emitió una carta de autorización para poder procesar las muestras.
- No se utilizaron nombres de los pacientes, solamente códigos (todos fueron anónimos).

Confidencialidad de los resultados:

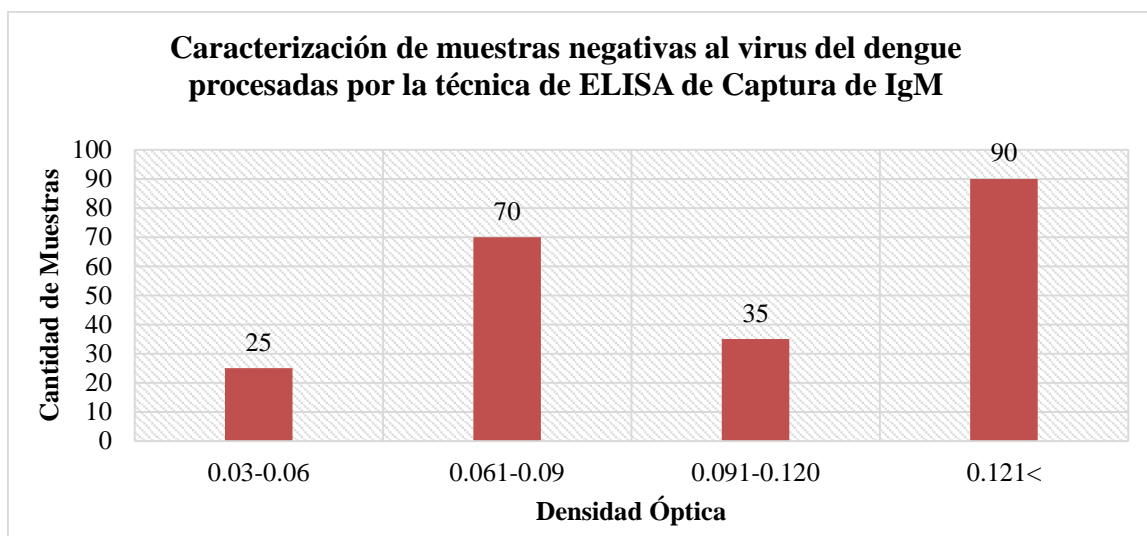
Todos los datos e información serán estrictamente confidenciales respetando la privacidad y apegados a las leyes vigentes para tal caso. Los datos serán guardados en una computadora y papel sólo para la evaluación de los mismos. Estos estarán a cargo de los investigadores principales y se archivarán por el tiempo que sea necesario para el estudio, no serán de acceso a nadie ajeno al estudio.

Potenciales riesgos:

Durante el procesamiento de las muestras se aplicaron las buenas prácticas de laboratorio y normas de bioseguridad establecidas. A pesar de ello se considera que se estuvo expuesto a riesgo de una biocontaminación, ya que la OMS establece que toda muestra que se procesa en el área de laboratorio debe ser considerada potencialmente infecciosas.

8. Análisis y discusión de los Resultados

Gráfico 1: Caracterización de muestras negativas al virus del dengue procesadas por la técnica de ELISA de Captura de IgM



Fuente: Tabla No. 1

El total de muestras negativas obtenidas de la seroteca de dengue del CNDR – MINSA sumaron un total de 220 y de estas 130 están entre una densidad óptica (DO) de 0.05 a 0.1

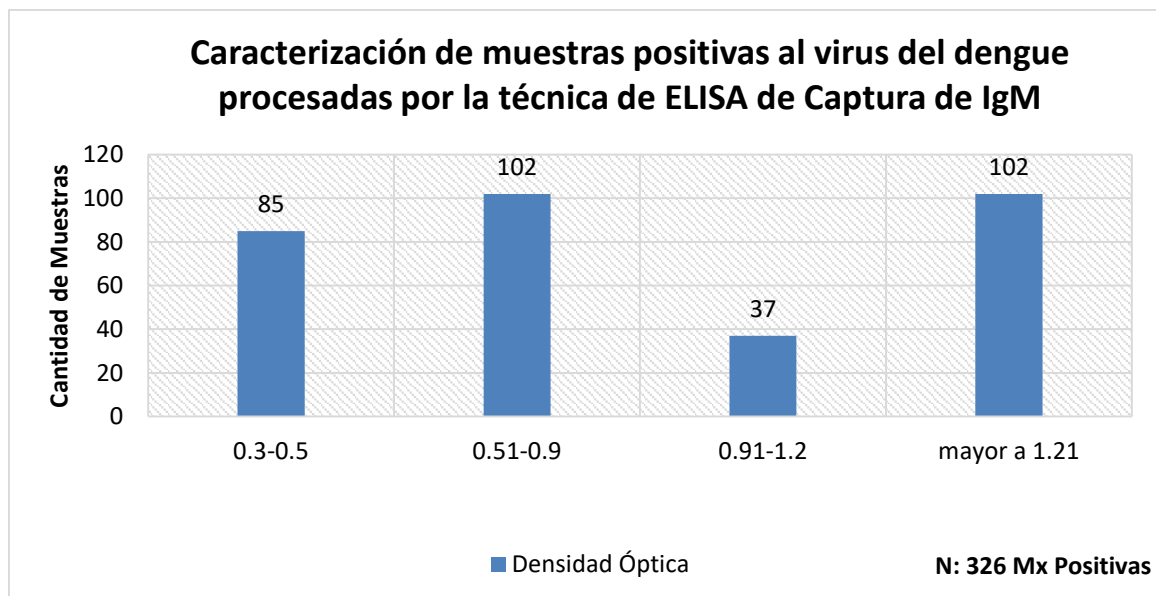
El gráfico de caracterización de muestras negativas para el virus del dengue, nos indica la cantidad de muestras que fueron procesadas y sus respectivas DO; De las cuales 25 Mx tiene DO entre 0.03 y 0.06, 70 entre 0.061 y 0.09, 35 entre 0.091 y 0.129 y 90 muestras que tienen más de 0.121 de DO.

Para preparar los paneles de proficiencia utilizando muestra seca en tubo (MST) se requiere de muestras característicamente negativas, es por ello que se incluyeron 220 muestras que tuvieran DO menor a 0.1. Las 220 muestras según los valores de DO son características negativas. Pero se incluyeron las que tienen DO de 0.05 a 0.1, que suman 130, por los motivos a continuación detallados:

1. Cuando se procesan muestras por el método de ELISA, es posible que se obtenga un excesivo ruido de fondo, lo que produce la obtención de DO bajas. Esto puede suceder por las siguientes razones (Abyntek, 2015):
 - 1.1. Cuando la solución de lavado no es preparada con agua destilada adecuada.
 - 1.2. Sustrato presenta color antes de añadirlo a la placa (podría haber sufrido cierta degradación).

- 1.3. Solución de lavado preparada con volumen de agua destilada y buffer incorrectos.
 - 1.4. La temperatura ambiente óptima se sitúa entre 18-25°C y asegurarse que la incubadora está en temperatura de 37°C.
 - 1.5. Reactivos deben prepararse de manera correcta.
 - 1.6. Los lavados hacerlos de forma correcta; la cantidad de lavados indicados en la técnica y el volumen de la solución de lavado según procedimientos establecidos.
2. También cuando se obtienen DO demasiado bajas puede suceder por los motivos a continuación descritos (Abyntek, 2015):
 - 2.1 Los reactivos y/o las placas no deben estar a una temperatura demasiado baja.
 - 2.2 Sobrepasar el número de ciclos de lavado
 - 2.3 Respetar los tiempos de incubación establecidos en el procedimiento operativo estándar.
 - 2.4 Cantidades de antígeno y/o anticuerpo utilizadas deben ser suficientes.

Gráfico 2: Caracterización de muestras positivas al virus del dengue procesadas por la técnica de ELISA de Captura de IgM



Fuente: tabla No. 2

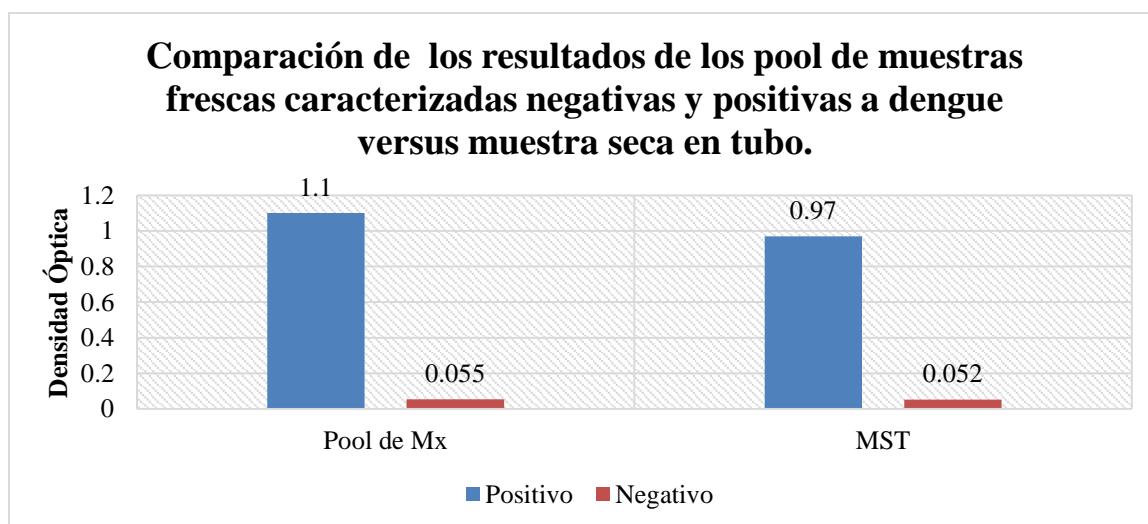
El gráfico de caracterización de muestras positivas para el virus del dengue, detalla la cantidad de muestras que fueron procesadas y sus respectivas DO; De las cuales 85 Muestras tienen DO entre 0.3 y 0.5, 102 entre 0.51 y 0.9, 37 entre 0.91 y 1.2 y 102 muestras que tiene más de 1.21 de DO.

Para preparar los paneles de proficiencia utilizando muestra seca en tubo (MST) se requiere de muestras caracteriscamente positivas, es por ello que se incluyeron 326 muestras que tuvieran DO mayor a 0.3. Las 326 muestras según los valores de DO son características positivas. Pero se incluyeron las que tienen DO mayor a 0.5 que suman 241.

Un valor de corte máximo según la técnica de captura de IgM dengue podría ser de 0.3 y se consideran verdaderas positivas todas aquellas muestras que están con una densidad óptica mayor al 10% del valor de corte. Y si se tuviera un valor de corte de 0.3 más 10% la DO de una muestra característica positiva seria mayor a 0.33.

Para la preparación de los paneles de proficiencia para control externo de la calidad de dengue utilizando muestra seca en tubo, se estableció que los característicos positivos tuviesen DO mayor a 0.5 porque es un valor de DO considerablemente alejado del valor de corte y además es un valor que jamás será admitido como si la muestra estuviese en zona gris.

Gráfico 3: Comparación de los resultados de los pool de muestras frescas caracterizadas negativas y positivas a dengue versus muestra seca en tubo.



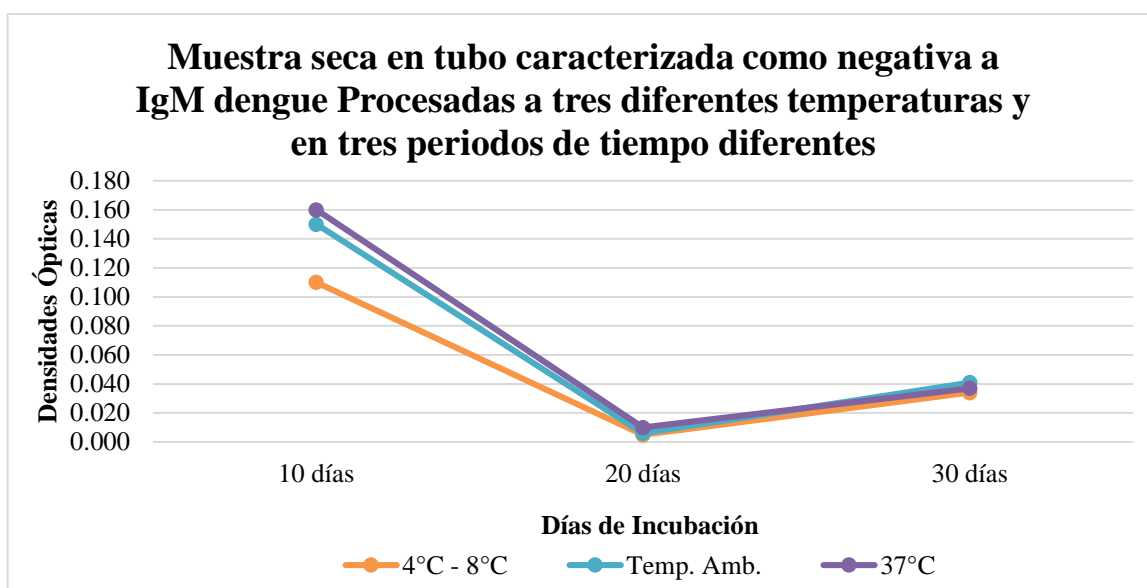
Fuente: Tabla No. 3

En este gráfico podemos observar que la muestra fresca del pool de positivas a dengue presento una DO de 1.1 y la muestra seca en tubo (MST) presento una DO de 0.97.

En el caso de la muestra fresca del pool de negativas a dengue dieron una DO de 0.055 y la MST dio 0.052. Se pudo observar que no hubo una variación significativa en los valores de DO en las muestras frescas y las muestras secas en tubo. Lo cual demostró que la muestra seca en tubo es estable 2 días después de haber sido preparadas.

Estos resultados condujeron a considerar la posibilidad de que la muestra seca en tubo es viable que sea utilizada para la preparación de paneles de proficiencia para el control externo de la calidad de dengue.

Gráfico 4: Muestra seca en tubo caracterizada como negativa a IgM dengue Procesadas a tres diferentes temperaturas y en tres periodos de tiempo diferentes.



Fuente: Tabla No. 4

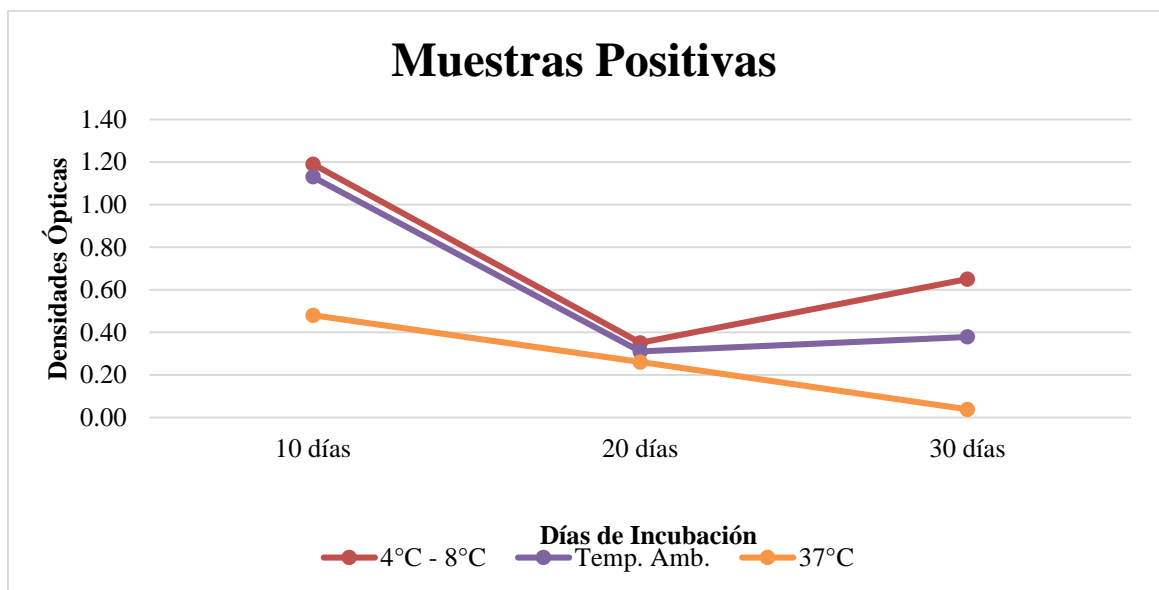
El gráfico de la muestra seca en tubo caracterizadas como negativas a las tres diferentes temperaturas, demostró que en los primeros 10 días los resultados de las muestras que están a temperatura entre 4 – 8 °C y a temperatura ambiente tienen una densidad óptica entre 0.110 y 0.150, en cambio a los 37°C se observó que poseen un valor de (0.160) y el valor de corte de esa corrida fue de 0.267, lo que permitió evidenciar que la MST se mantuvo con valores de DO característicamente negativos.

A los 20 días, se notó una disminución drástica de las densidades ópticas las cuales oscilaron en valores de DO de 0.004 a 0.024, el valor de corte para esta corrida fue de 0.182. Esto nos hizo presumir que la MST a los 20 días perdía estabilidad y por ende la posibilidad de usar paneles de proficiencia después de los 10 días.

A los 30 días, las densidades ópticas de la MST negativas, a las tres temperaturas se incrementaron en relación al periodo de los 20 días, las DO oscilaron entre 0.034 a 0.055 con un valor de corte de 0.156. Se consideró que posiblemente haya habido inconvenientes con el procesamiento de las muestras a los 20 días de incubación o bien afecto los resultados algunos de los componentes del kit utilizado, a pesar de que los controles validaron la técnica.

Se estima que con este experimento las muestras más viables para ser utilizadas para el control externo de la calidad en dengue son las que se procesaron a los diez días de incubación a temperatura ambiente y a temperatura de 4 – 8°C lo que implica que el tiempo de estabilidad de la MST es de 10 días, lo que indico que es conveniente utilizar los paneles de proficiencia usando MST en un lapso de 5 a 10 días después de haber sido preparados los paneles.

Grafico 5: Muestra seca en tubo caracterizada como positiva a IgM dengue Procesadas a tres diferentes temperaturas y en tres periodos de tiempo diferentes



Fuente: Tabla No. 5

El gráfico de la muestra positiva (MST) a diferentes temperaturas, indica que en los primeros 10 días los resultados de la MST que están a temperatura entre 4 - 8°C y a temperatura ambiente tienen una densidad óptica entre 1.13 – 1.19, en cambio a los 37°C se observó que posee un valor de densidad óptica de 0.48. El valor de corte de esa corrida fue de 0.267.

A los 20 días en las tres diferentes temperaturas, se observó una disminución de los valores de densidad óptica, lo cual orienta a que las muestras perdieron estabilidad en cuanto a los títulos de anticuerpos IgM dengue.

En el periodo de los 30 días, las densidades ópticas a las tres temperaturas se incrementaron en relación al periodo de los 20 días. Se consideró que posiblemente haya habido inconvenientes con el procesamiento de las muestras a los 20 días de incubación o bien afectó los resultados algunos de los componentes del kit utilizado, a pesar de que los controles validaron la técnica.

Se estima que con este experimento las muestras más viables para ser utilizadas para el control externo de la calidad en dengue son las que se procesaron a los diez días de incubación a temperatura ambiente y a temperatura de 4 – 8°C lo que implica que el tiempo de estabilidad de la MST es de 10 días, lo que indico que es conveniente utilizar los paneles de proficiencia usando MST en un lapso de 5 a 10 días después de haber sido preparados los paneles.

9. Conclusiones

- Las diferentes etapas para la elaboración de los paneles de proficiencia usando muestra seca en tubo se desarrollaron de manera similar a las utilizadas para la elaboración de paneles de proficiencia usando MST en VIH.
- Los resultados de los pool de muestra fresca y muestra seca en tubo, procesados por la técnica de ELISA de captura de IgM dengue arrojaron densidades ópticas similares. Estos datos dieron lugar a poder proseguir con el experimento y además orientaron a pensar que la MST utilizada para control externo de la calidad en VIH puede también ser utilizada para el control externo de la calidad en serología de dengue.
- Las muestra seca en tubo positivas y negativas se procesaron a los diez, veinte y treinta días a las temperaturas de: 4 – 8 °C, temperatura ambiente y a 37 °C. Teniendo como resultado que la MST procesada a los 10 días a temperaturas de: 4 – 8 °C y a temperatura ambiente las MST preservan la estabilidad ya que las negativas dieron resultados verdaderos negativos y las positivas dieron resultados verdaderos positivos.

10. Recomendaciones

Ministerio de Salud e instituciones involucradas.

- Documentar el procedimiento en el área de serología de dengue (elaboración de procedimientos operativos estándar)
- Capacitar al personal de la red diagnóstica de dengue en el procesamiento de los paneles de proficiencia utilizando muestra seca en tubo.
- Realizar un piloto para verificar que los paneles de proficiencia usando muestra seca en tubo son funcionales para realizar el control externo de la calidad en dengue.
- Una vez comprobada la funcionalidad de la MST, preparar al menos 4 paneles al año para ser distribuidos a todas las unidades de salud que procesan muestras para el diagnóstico de dengue.
- Se sugiere implementar el uso de los paneles de proficiencia con MST lo más pronto posible para así evitar los altos costos que conlleva el sistema de control de calidad establecido hasta la fecha.

11. Bibliografía

- Abyntek. (8 de Diciembre de 2015). *6 Tips para solucionar problemas en un inmunoensayo ELISA*. Recuperado el Julio de 2017, de <http://www.abbyntek.com/6-tips-para-solucionar-problemas-en-un-inmunoensayo-elisa/>
- Advisors, I. D. (2012). *Sistema de Gestión de la Calidad en Laboratorios Clínicos ISO 15189*. Recuperado el Abril de 2017, de http://www.intedya.com/internacional/fichasproducto/Presentacion_sistema-de-gestion-de-la-calidad-en-laboratorios-clinicos
- Ampie O., S. G. (2016). *EVALUACIÓN DE LA UTILIDAD DE LOS PANELES DE PROFICIENCIA UTILIZANDO MUESTRA SECA EN TUBO (MST) EN LAS PRUEBAS RAPIDAS DE VIH DE LOS CENTROS DE SALUD Y HOSPITALES DEL SILAIS MANAGUA EN EL PERIODO OCTUBRE 2013 A ENERO 2016*. Managua, Nicaragua.
- Anonimo. (5 de Mayo de 2016). Nicaragua declara alerta epidemiológica para intensificar lucha contra el dengue, chikungunya y zika. *El 19 por más victorias*.
- Bharat S. Parekha, J. A.-Y. (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*. Estados Unidos: ELSEVIER - CDC Atlanta.
- FAO. (1989). *El programa de la garantía de la calidad*. Recuperado el 19 de Marzo de 2017, de <http://www.fao.org/docrep/T0845S/t0845s05.htm>
- Guzmán M., P. J. (1996-2001). *Control externo de la calidad del diagnóstico serológico del dengue en laboratorios de países de las Américas*. Obtenido de http://www.scielosp.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1020-49892003001100001
- Handbook. (2011). *Laboratory Quality Management System*. Francia: World Health Organization 2011.
- Mineco, C. (2012). *Laboratorios Clínicos - Requisitos para la calidad y Competencia*. Guatemala: NTG/ISO 15189:2012.
- Sánchez L. (2016). *Sistema de Gestión de la Calidad en Laboratorios Clínicos ISO 15189*. Recuperado el 19 de Marzo de 2017, de http://www.intedya.com/internacional/fichasproducto/Presentacion_sistema-de-gestion-de-la-calidad-en-laboratorios-clinicos-iso-15189.pdf
- (2005). *Sistema de Gestión de la Calidad según ISO 9001:2000*. Ministerio de Fomento.

12. Anexos

Anexo 1:

Tabla 1: Caracterización de muestras negativas para dengue

Densidades ópticas	Cantidad de muestras procesadas por ELISA de captura IgM dengue
0.03-0.06	25
0.061-0.09	70
0.091-0.120	35
0.121<	90

Fuente: Protocolo de trabajo

Tabla 2: Caracterización de muestras positivas para dengue

Densidades ópticas	Cantidad de muestras procesadas por ELISA de captura IgM dengue
0.3-0.5	85
0.51-0.9	102
0.91-1.20	37
Mayor a 1.21	102

Fuente: Protocolo de trabajo

Tabla 3: Pool de muestras fresca versus muestra seca en tubo

	Positivo	Negativo
Pool de Muestra fresca	1.1	0.055
MST	0.97	0.052

Fuente: Protocolo de trabajo

**Tabla 4: Muestras seca en tubo caracterizadas como negativa a IgM dengue
Procesadas a tres diferentes temperaturas y en tres periodos de incubación
diferentes**

Días de incubación	4°C - 8°C	Temp. Amb.	37°C
10 días	0.110	0.150	0.160
20 días	0.005	0.006	0.010
30 días	0.034	0.041	0.037

Fuentes: Protocolo de trabajo

**Tabla 5: Muestras seca en tubo caracterizadas como positiva a IgM dengue
Procesadas a tres diferentes temperaturas y en tres periodos de incubación
diferentes**

	4°C - 8°C	Temp. Amb.	37°C
10 días	1.19	1.13	0.48
20 días	0.35	0.31	0.26
30 días	0.65	0.38	0.04

Fuente: Protocolo de trabajo

Anexo 2: Operacionalización de las Variables

Variables	Concepto	Indicador	Valores	Criterios
Muestra	Muestras previamente procesadas para control de calidad en serología de dengue.	Niveles de Absorvancias con la tecnica ELISA de captura IgM dengue	Positiva: Densidad optica de la muestra mayor al valor de corte Negativa: Densidad optica de la muestra menor al valor de corte	Si - No
Pool de muestras	Combinación de todas las muestras positivas o negativas.	Positiva Negativa	Densidad optica de la muestra mayor al valor de corte Densidad optica de la muestra menor al valor de corte	Si - No
Caracterización de los pools de muestras	Determinar que los pool de muestras positivos son realmente positivos y que los pool de muestras negativos son realmente negativos.	Positiva Negativa	Densidad optica de la muestra mayor al valor de corte Densidad optica de la muestra menor al valor de corte	Si - No
Muestra seca en tubo	Elaboración de las muestras caracterizadas positivas y negativas agregandole 0.01% de colorante Green dai	Alicuotas con 20 ul de muestra preparada positiva o negativa.	Alicuotas incubadas a temperatura ambiente en cabina de flujo laminar.	Si - No
		Formacion de botón de muestra seca en el fondo del criovial	Visualizacion del botón de color verde en estado seco	Si - No
		Hidratación de muestra seca en tubo positiva y negativa	Colocar 200ul de PBS-T0.1% Incubar durante 24 horas a temperatura ambiente	Si - No
		Procesamiento de las muestras ya hidratadas	Densidad optica de la muestra mayor al valor de corte	Positiva
			Densidad optica de la muestra menor al valor de corte	Negativa
Muestra seca en tubo incubada a los 10 días	Determinar positividad y negatividad en el tiempo	4 - 8 °C Temperatura Ambiente 37 °C	Positivo Negativo	Si - No
Muestra seca en tubo incubada a los 20 días	Determinar positividad y negatividad en el tiempo	4 - 8 °C Temperatura Ambiente 37 °C	Positivo Negativo	Si - No
Muestra seca en tubo incubada a los 30 días	Determinar positividad y negatividad en el tiempo	4 - 8 °C Temperatura Ambiente 37 °C	Positivo Negativo	Si - No

Anexo 3: Artículo del CDC referido a la elaboración de la muestra seca en tubo para paneles de proficiencia en VIH.

G Model

VIRMET-11041; No. of Pages 6

ARTICLE IN PRESS

Journal of Virological Methods xxx (2009) xxx–xxx



ELSEVIER

Contents lists available at [ScienceDirect](#)

Journal of Virological Methods

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jviomet



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

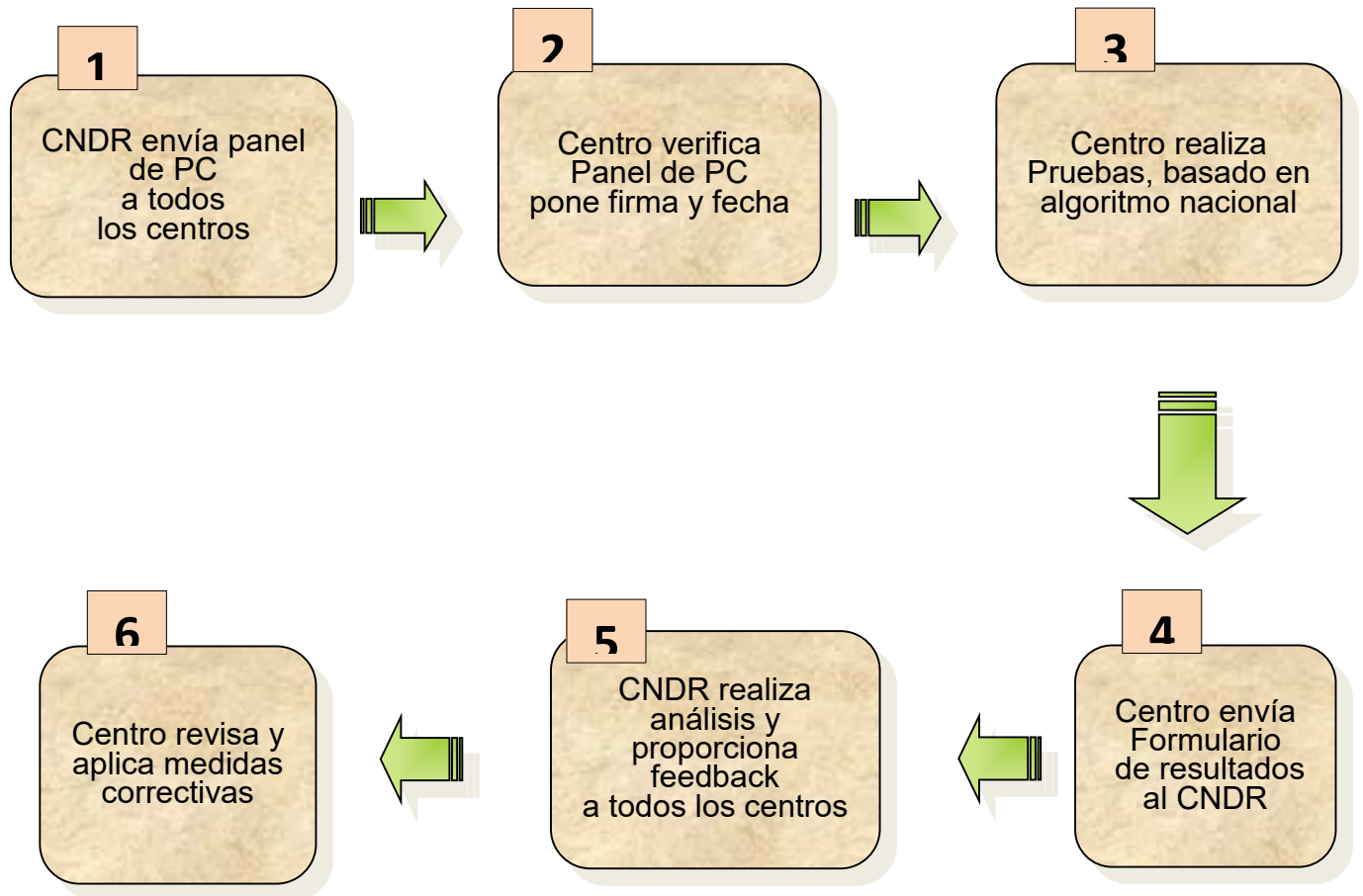
Bharat S. Parekh^{a,*}, Juliana Anyanwu^a, Hetal Patel^a, Marie Downer^{a,c}, Mireille Kalou^a, Catherine Gichimu^b, Bera Steven Keipkerich^b, Nelly Clement^b, Michael Omondi^a, Oren Mayer^a, Chin-Yih Ou^a, John N. Nkengasong^a

^a International Laboratory Branch, Division of Global AIDS, Centers for Disease Control and Prevention, Atlanta, GA, United States

^b National Public Health Laboratory, Nairobi, Kenya

^c CDC-Cambodia, Sangkat Wat Phnom, Cambodia

Proceso de pruebas de competencia



Anexo 5: Preparación de la muestra seca en tubo



Anexo 6: Fase pre analítica, analítica y post analítica en el laboratorio

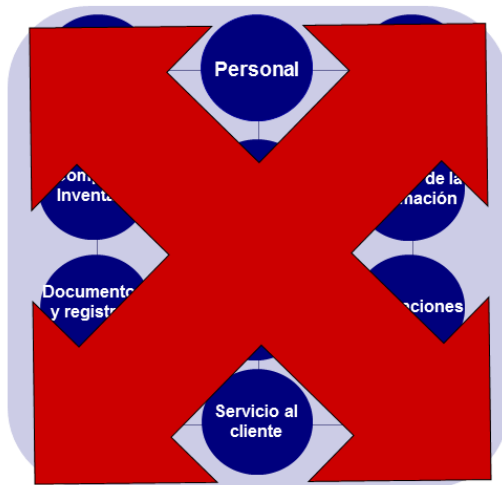


Anexo 7: Sistema de Gestión de la Calidad



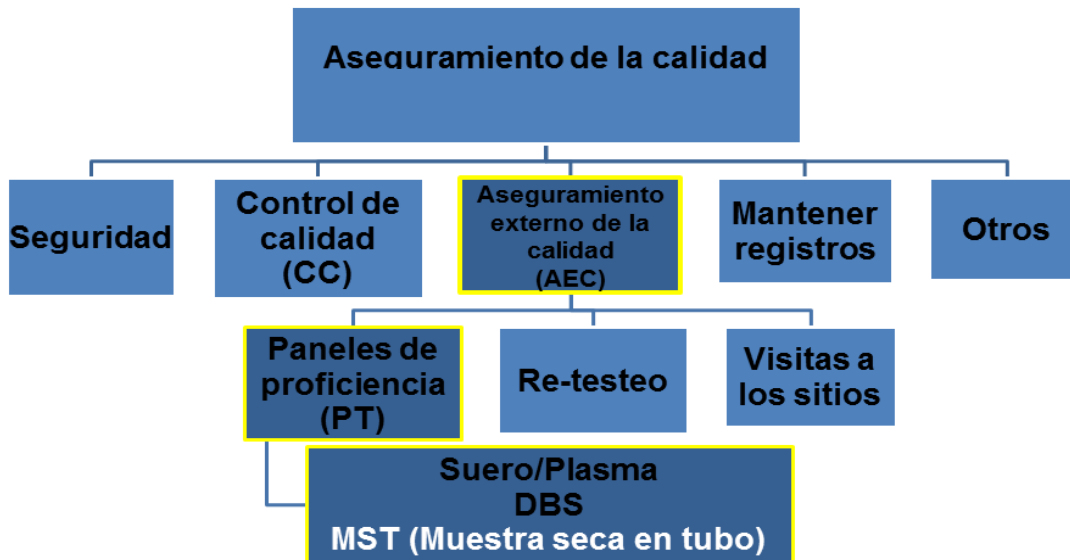
Implementar sistemas de gestión de calidad, **NO Garantiza** laboratorios ***LIBRES DE ERRORES***

Pero detecta errores que pueden ocurrir y prevenir que vuelvan a pasar

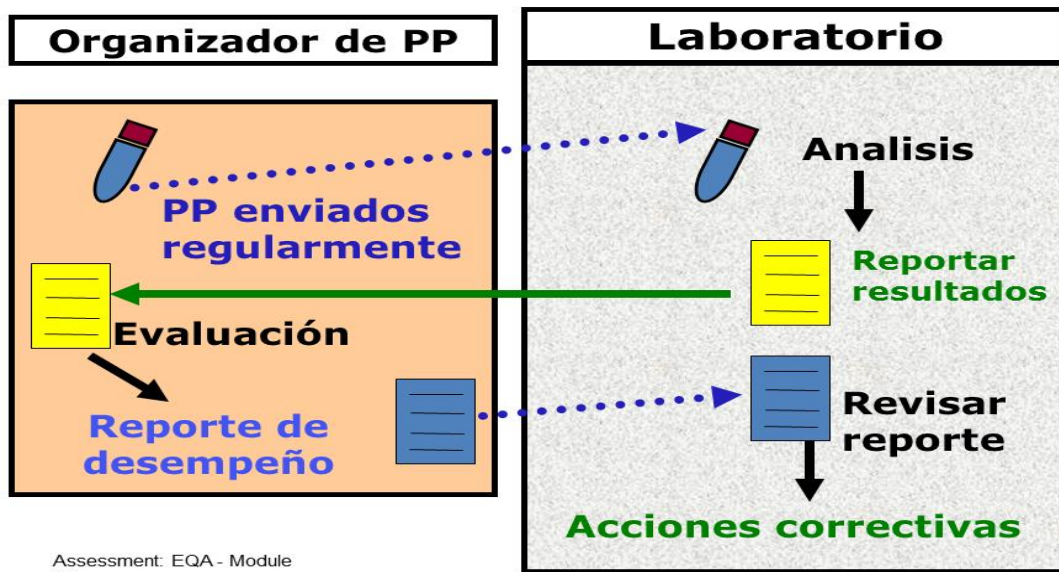


Laboratorios donde no se implementa Sistemas de gestión de Calidad garantizan errores **No detectados**

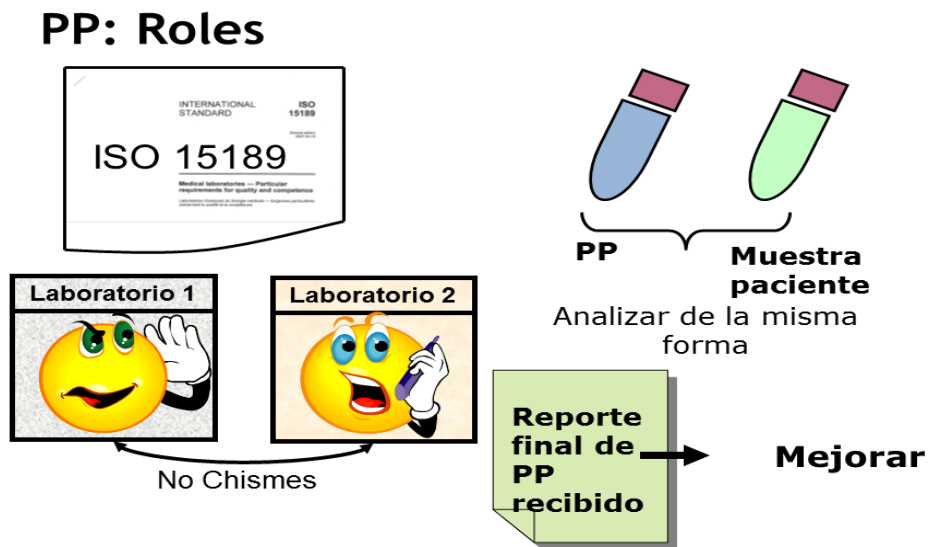
Anexo 8: Aseguramiento de la Calidad



Anexo 9: Proceso grafico de la Evaluación Externa de la Calidad

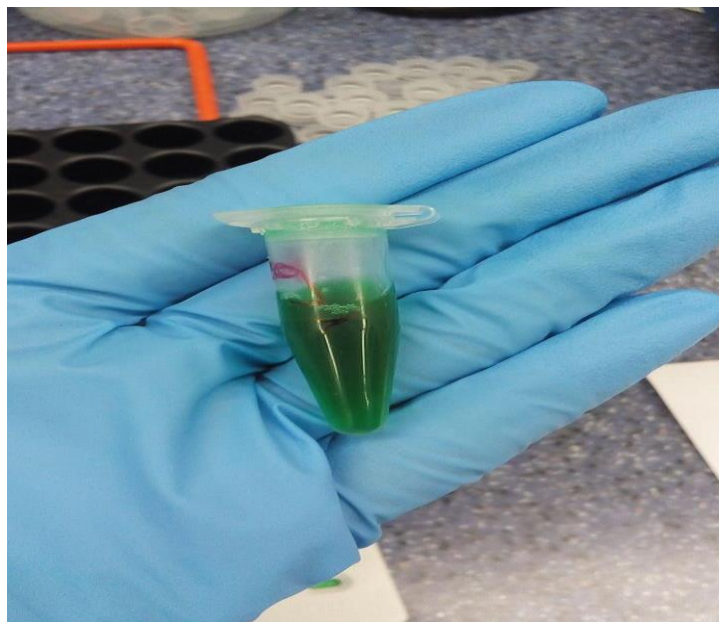


Anexo 10: Confidencialidad al momento de participar en la EEC.



Anexo 11:

Pool de muestra con colorante de Green dai al 0.1%



Boton de muestra seca con colorante Green dai en crioviales de fondo conico

