



COMITÉ DE EDUCACIÓN CONTINUA Y CONTINUADA

COORDINADORA: DRA ANA CLAUDIA PERÓN

PROGRAMA CONSULTA AL EXPERTO

COORDINADORA: DRA GRACIELA LEÓN DE GONZÁLEZ

“ TAMIZAJE PARA ENFERMEDADES INFECCIOSAS EN BANCOS DE SANGRE: PRUEBAS, ESTRATEGIAS Y CONTROL DE CALIDAD”

PROFESOR INVITADO: DR AMADEO SÁEZ-ALQUEZAR

Farmacéutico-Bioquímico (Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de São Paulo). **Maestría en Análisis clínicos y toxicológicos** (Facultad de Farmacia y Bioquímica de la Universidad de São Paulo)

Asesor Científico para Inmunología y Bancos de Sangre del Programa Nacional de Control de Calidad PNCQ – Brasil, Consultor do Department of Control of Neglected Tropical diseases of the World Health Organization (WHO)

amadeo62@gmail.com

Glosario

HIV: Virus de la inmunodeficiencia Humana; **HTLV:** Virus linfotrópico de las células T humanas; **HCV:** Virus de la hepatitis C; **HBV:** Virus de la hepatitis B; **CMV:** Citomegalovirus; **HEV:** Virus de la hepatitis E; **ADN:** Ácido desoxirribonucleico; **ARN:** Ácido ribonucleico; **VDRL:** Venereal Diseases Research Laboratory; **RPR:** Rapid plasma reagin; **ELISA:** Enzyme-linked immunosorbent assay; **CLIA:** Chemiluminescent Immuno Assay; **e-CLIA:** electro Chemiluminescent Immuno assay; **CMIA:** Inmunoensayo quimioluminiscente magnético; **PDR/POCT:** Pruebas diagnósticas rápidas/ Point of care testing; **OMS:** Organización Mundial de la Salud; **PCR:** Polymerase Chain reaction; **HAI:** Hemaglutinación indirecta; **IFI:** Inmuno fluorescencia Indirecta. **BS:** Bancos de sangre; **POE:** Procedimientos operacionales estándar; **RFR:** Resultados falsos reactivos; **RFNR:** Resultados falsos no reactivos.

Introducción (1, 2, 3)

El escenario actual del tamizaje serológico para enfermedades infecciosas en bancos de sangre incluye el uso de pruebas serológicas cualitativas para HIV, HTLV, HCV, HBV y sífilis. En los países de América Latina, endémicos para la enfermedad de Chagas, se realiza el tamizaje para anti-*T.cruzi* y también en países no endémicos donde exista el riesgo de transmisión del *T.cruzi*, sea por transfusión o del Chagas congénito.

De acuerdo con las características epidemiológicas, procedencia de los donantes y del destino de las unidades recolectadas, los países pueden adicionar pruebas específicas para el tamizaje de los donantes, como es el caso del CMV, Malaria, Brucelosis; Virus del Nilo; Virus de la hepatitis E (HEV) o algún Arbovirus.

En paralelo con las pruebas serológicas se recomienda utilizar pruebas moleculares NAT (nucleic acid amplification technology), que permiten detectar e identificar ácidos nucleicos (DNA / RNA) para HIV, HBV y HCV en las muestras de donantes y permiten reducir el período de ventana para la infección por esos virus de forma significativa. Estados Unidos fue uno de los primeros países en adoptar las pruebas NAT; para HIV y HCV en 1999 y para HBV en 2009. Otros países de Latinoamérica tardaron más para implementar esas pruebas y algunos todavía no las han adoptado de manera obligatoria. En Brasil pasaron a ser obligatorias las pruebas NAT para HIV y para HCV en 2013 y para HBV en 2016.

En la **figura 1** se puede observar el tamizaje serológico/molecular que es obligatorio en Brasil, en donantes de sangre. Para HIV un inmunoensayo de 3^a o 4^a generación; para HTLV un inmunoensayo que detecte anticuerpo dirigidos a los tipos HTLV-1 y HTLV-2; para el HBV dos pruebas serológicas: una que detecte la presencia del Ag HBs y otra para el anti-HBc total; para el HCV un inmunoensayo que detecte anticuerpos anti-HCV o una prueba “combo” que detecte Ag core además del anti-HCV; para sífilis un inmunoensayo específico

para anti-*T pallidum* o una prueba no-treponémica tipo VDRL o RPR; y para Chagas un inmunoensayo de alta sensibilidad para detectar anticuerpos anti-*T cruzi*. En paralelo al tamizaje serológico es obligatorio el uso de pruebas NAT para HIV, HCV y HBV que en general se realiza en pool de seis muestras.

Figura 1

Tamizaje obligatorio para donantes de sangre en Brasil (2)

Parámetro	Nº pruebas	Ensayo serológico	NAT
HIV	01	Anti-HIV 1+2+”O” o Combo (Ac / Ag p24)	+
HTLV	01	Anti-HTLV I/II	
HBV	02	Ag HBs y Anti-HBc (IgG o total)	+
HCV	01	Anti-HCV o Combo (Ac/Ag core)	+
Sífilis	01	Anti-T.pallidum o VDRL / RPR	
Chagas	01	Anti-T.cruzi	
CMV	01	Anti CMV IgG	Opcionales
Malaria	01	Ag	

Las pruebas opcionales corresponden a la detección de CMV que se realiza únicamente en las unidades de sangre destinados a los pacientes sometidos a trasplantes de células progenitoras y de órganos con serología no reactiva para CMV, para recién nacidos que pesen al nacer menos de 1.200g, de madres CMV negativas o con resultados serológicos desconocidos y también para transfusiones intrauterinas. Para malaria el tamizaje es obligatorio en regiones endémicas donde exista, transmisión activa, independiente de la incidencia parasitaria de la enfermedad. Se recomienda una prueba para detección del plasmodio o de antígenos plasmodiales.

La efectividad del tamizaje serológico/molecular en donantes de sangre es un factor de fundamental importancia para evitar la transmisión de los principales agentes etiológicos de las enfermedades transmisibles por transfusión. A ese respecto debemos considerar que se obtienen excelentes resultados cuando trabajamos dando atención especial a algunos factores como la selección adecuada de donantes; el uso de pruebas serológicas y moleculares de buena calidad; la adopción de estrategias con flujogramas y algoritmos bien

establecidos dentro de procedimientos estrictos de control de calidad (interno y externo) y también por la participación en programas de vigilancia epidemiológica.

Selección adecuada de donantes (4)

La selección adecuada de donantes es importante para disminuir el riesgo de transmisión de agentes infecciosos. Lo mejor sería si pudiésemos contar, en su mayoría, con donantes altruistas voluntarios de repetición. Infelizmente en la mayoría de los países de América Latina, todavía predominan los donantes de reposición que, aunque sean voluntarios no atienden a las especificaciones de seguridad que se observan con el otro tipo de donantes.

Pruebas serológicas

Actualmente las pruebas serológicas usadas en el tamizaje de donantes son inmunoensayos comerciales con metodologías por ELISA, CLIA y e-CLIA con distintos grados de desempeño. Las pruebas de ELISA que fueron usadas preferencialmente por muchos años, están dando lugar a las pruebas por CLIA y e-CLIA que presentan mejor sensibilidad y poseen plataformas para procesamiento de las muestras de forma rápida y segura y que al mismo tiempo, permiten opciones para pequeños, medianos y grandes volúmenes de montajes o procesos. La diferencia entre las pruebas es que en el CLIA ocurre la producción de luz por excitación a través de una reacción química y en el caso de la e-CLIA es por excitación de un estímulo eléctrico. Todos los equipamientos y plataformas para el procesamiento de inmunoensayos por ELISA/CLIA/e-CLIA, son sistemas cerrados.

En Brasil, los laboratorios de tamizaje de donantes de sangre que participaron de un programa de aptitud en 2016, reportaban el uso de inmunoensayos ELISA en alrededor del 50% de las pruebas y 50% en el uso de CLIA/e-CLIA. A partir de 2018 los participantes pasaron a reportar cada vez menos el uso de pruebas ELISA siendo que en 2022 más del 90% de los laboratorios participantes reportaban el uso de pruebas CLIA/e-CLIA. **(Fig. 2)** Eso muestra una tendencia general, con algunos grados de amplitud, de acuerdo con los países considerados. En general esa tendencia está asociada a la rapidez en el procesamiento de medianos y grandes volúmenes de montajes o procesos y a la mejor sensibilidad y especificidad de esas metodologías. Sin duda la oferta de plataformas con esas metodologías es cada vez mayor en el mercado internacional.

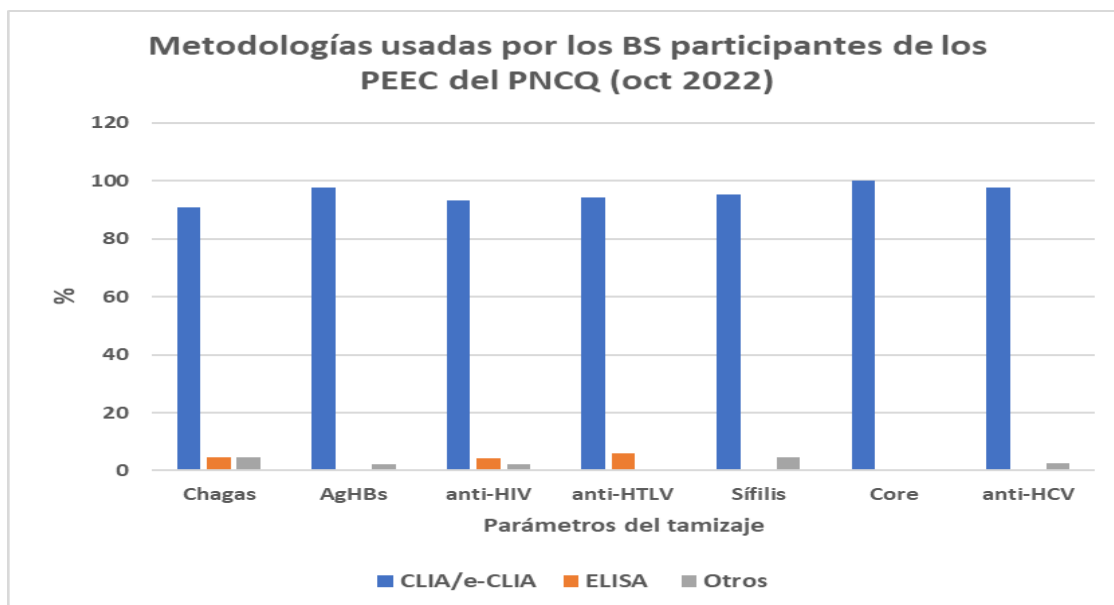


Figura 2: Metodologías usadas por los LP (laboratorios participantes) del programa de aptitud desarrollado en bancos de sangre por el Programa Nacional de controle de Qualidade (PNCQ) en Brasil. ELISA: Enzyme-linked immunosorbent assay; CLIA: Chemiluminescent Immuno Assay; e-CLIA: electro Chemiluminescent Immuno assay

Comparando el desempeño entre las pruebas de CLIA /eCLIA con las pruebas ELISA, se observa que los inmunoensayos CLIA/eCLIA tienen un alcance de detección mucho más amplio que los ELISAs y son extremadamente sensibles para detectar concentraciones de analitos muy bajas. Tampoco necesitan de ninguna reacción de parada, como en los ELISAs, lo que torna el procesamiento más rápido. La especificidad de los inmunoensayos CLIA/eCLIA se ha mostrado adecuada en el sentido de eliminar gran parte de los resultados falsos positivos que se observaban con las pruebas ELISA.

Además, tenemos las pruebas diagnósticas rápidas (PDR/POCT) que actualmente presentan buen desempeño y que podrán ser usadas en situaciones donde no sea posible utilizar los inmunoensayos convencionales.

Siempre es recomendable utilizar inmunoensayos comerciales que sean certificados por los entes regulatorios nacionales y evitar el uso de pruebas hechas en casa (in house). Esa es una manera de mantener constante la calidad de las pruebas, aunque sea adecuado verificar si en el cambio de lotes de reactivos se mantienen las especificaciones de sensibilidad y especificidad.

Pruebas de tamizaje para el HIV (2, 5, 6)

Se recomienda el uso de inmunoensayos de 3ª o 4ª generación con alta sensibilidad analítica y alta sensibilidad clínica (menor periodo de ventana) y que sean capaces de detectar diferentes cepas, variantes y formas recombinantes circulantes (CRFs). Al mismo tiempo se requiere que las pruebas tengan alta especificidad (>99,8%). Cuando utilizamos pruebas con alta sensibilidad en poblaciones de individuos con baja prevalencia, como es el caso de donantes de

sangre, el riesgo de surgimiento de resultados falsos positivos es más alto y por eso se requieren pruebas con alta especificidad.

El rendimiento mínimo aceptable para los ensayos de serología en la precalificación de la OMS es de 100% de sensibilidad y especificidad mayor que 98% para los inmunoensayos. Para las pruebas diagnósticas rápidas sensibilidad $\geq 99\%$ y especificidad $\geq 98\%$

Los inmunoensayos recomendados son los de 3ª generación que detectan anticuerpos anti-HIV1+2+“O” o los llamados “combo” que además de los anticuerpos detectan la presencia del Ag p24 del HIV.

Es importante tener en consideración las posibles causas de error que pueden ocurrir en el tamizaje y en el diagnóstico de la infección por HIV. Algunas de esas causas podrían ser:

- a) Bajo desempeño de las pruebas utilizadas que no consigan identificar cepas, variantes o formas recombinantes circulantes, o que presenten reactividad cruzada con otros agentes o cuando son influenciadas por interferentes (p/Ej. Biotina) presentes en la muestra.
- b) Cuando la persona se encuentra en el periodo de ventana inmunológica y todavía no se detecta la presencia de anticuerpos; (± 22 días para los inmunoensayos de 3ª generación y ± 18 días para las pruebas de 4ª generación (Ag/Ac)
- c) En el caso de individuos llamados “Inmuno silenciosos” que son personas infectadas por el HIV que poseen niveles muy bajos o ausentes de anticuerpos específicos anti-HIV, no siendo detectados por las pruebas serológicas.
- d) “Controladores de élite”, personas ($< 1,0\%$), infectadas por el HIV que presentan anticuerpos anti-HIV, que son detectados por las pruebas serológicas, pero presentan consistentemente, por lo menos durante un año, carga viral inferior al límite de detección.
- e) Errores que pueden ocurrir en las fases, pre analítica, analítica y post analítica, del procesamiento en el laboratorio.

Pruebas de tamizaje para el HTLV (7, 8)

Existen 4 tipos del virus linfotrópico de las células T humanas HTLV: HTLV-1, HTLV-2, HTLV-3 y HTLV-4. El más patogénico es el HTLV-1, identificado en 1980, que está asociado a enfermedades graves como la Leucemia/Linfoma de las células T del adulto (LLTA) y la Paraparesia espástica tropical /Mielopatía asociada al HTLV (TSP/HAM). Otras enfermedades inflamatorias, como uveítis y dermatitis también están asociadas al HTLV-1. El HTLV-2, identificado en 1982, en general puede producir enfermedades neurológicas moderadas. Tanto el HTLV-1 como el HTLV-2 tiene una distribución geográfica global. Se estima que el HTLV-1 afecte a más de 10 millones de personas en el mundo. El HTLV-3 y el HTLV-4 han sido identificados únicamente en África Central y afectan solamente a humanos homínidos.

Las principales vías de transmisión del HTLV son la sanguínea, vertical y sexual. La transmisión por la sangre ocurre por uso de sangre total o productos que contengan células sanguíneas o por el uso de agujas y jeringas contaminadas en el caso de usuarios de drogas IV. La transmisión vertical puede ocurrir a través de la placenta, perinatal o por la lactancia materna. La transmisión sexual parece ser más eficiente del hombre a la mujer y se puede evitar por el uso de preservativos.

Se recomienda el tamizaje para HTLV en donantes de sangre, órganos y tejidos en poblaciones donde se observe prevalencia significativa de la infección, como ocurre en países de la región del Caribe, Centro América, América del Sur, países del África sub Sahariana, suroeste del Japón, Australo-Melanesia y Oriente Medio. El tamizaje y el diagnóstico está basado principalmente en las pruebas para detectar anticuerpos que incluyen los inmunoensayos por ELISA, CLIA y e-CLIA. Se recomienda que las pruebas sean capaces de identificar anticuerpos para el HTLV-1 y para el HTLV-2. En algunas situaciones se han utilizado pruebas de aglutinación de partículas (AP). Los inmunoensayos con alta sensibilidad y mejor especificidad son los que emplean antígenos recombinantes (péptido sintético HTLV-I/HTLV-II y HTLV-II) recubriendo las micropartículas o placas en la captura de los anticuerpos presentes en la muestra y en la segunda etapa usan conjugados con péptidos sintéticos HTLV-I/HTLV II y antígeno recombinante HTLV-I para la captura de los anticuerpos de HTLV que fueron capturados en la primera etapa. Inmunoensayos que detectan simultáneamente anticuerpos del tipo IgA, IgM e IgG permiten una detección precoz de la infección.

Para la confirmación de la infección por el HTLV-1/HTLV-2 se utilizan pruebas serológicas tipo Western Blot (WB) o Inmuno Blot (IB), consideradas pruebas suplementarias, que en la mayoría de las veces son suficientes para confirmar el diagnóstico y también para identificar el tipo de HTLV, 1 o 2. Cuando no se consigue identificar el tipo de HTLV por las pruebas suplementarias se pueden utilizar pruebas moleculares, tipo PCR para detectar el HTLV pro-viral, en muestras de sangre periférico.

Pruebas de tamizaje para el virus de la hepatitis B (2, 9, 10)

El virus de la hepatitis B (HBV) es un virus con envoltura lipídica y genoma de DNA que contiene principalmente tres fracciones antigénicas, a saber, el antígeno de superficie (AgHBs) el antígeno e (AgHBe) y el antígeno core (AgHBc). Los dos primeros y los anticuerpos correspondientes: Anti-HBe, anti-HBc y anti-HBs, corresponden a los llamados marcadores inmunológicos de la infección por el HBV (el AgHBc no se utiliza porque generalmente está formando inmunocomplejos). Existen dos formas del anti-HBc, el tipo IgM que se observa en la fase aguda de la infección y el IgG o total que permanece después de la fase aguda, sea para la cura o en la evolución para formas crónicas.

La mejor manera de realizar el tamizaje para HBV en donantes de sangre es por la utilización en paralelo del Ag HBs y del Anti-HBc total. El anti-HBc total permite reducir el riesgo residual de transmisión del HBV y es útil en la identificación de casos de hepatitis B oculta (HBO). El uso de pruebas NAT-DNA en paralelo al

tamizaje serológico acorta el periodo de ventana de la infección de 60 días (con el tamizaje por Ag HBs) a alrededor de 10 días y resulta en una disminución aún mayor del riesgo residual de la infección por el HBV.

Llevando en cuenta esas consideraciones podemos concluir que el tamizaje de donantes de sangre para evitar la transmisión del VHB por medio de un perfil serológico/molecular: Ag HBs, Anti-HBc y VHB - ADN por NAT, es bastante efectivo, pero se han observado algunas situaciones de riesgo residual, cuando de alguna manera se modifica la aplicación de ese perfil. En países con baja prevalencia de VHB, donde se adoptó el uso de NAT para ADN-VHB, en el tamizaje de donantes, pero se dejó de realizar la prueba de anti-HBc, se observó un aumento del riesgo residual de infección por VHB por transfusión, debido a casos de HBO. En realidad, no todas las formas de HBO pueden ser prevenidas pues en algunos casos de muestras de donantes con Anti-HBc reactivo, HBsAg No-reactivo y NAT para VHB - ADN Negativo, en pool de 6 muestras, cuando se hizo el PCR para ADN VHB, en muestras individuales se pudo observar un resultado positivo, que configuraba HBO.

Se considera que existe el riesgo de transmisión por transfusión del HBV cuando el tamizaje se realiza solamente con Ag HBs, sin anti-HBc y también cuando el tamizaje se realiza con Ag HBs y NAT, pero sin anti-HBc.

Pruebas de tamizaje para el virus de la hepatitis C (3, 10, 11)

El virus de la hepatitis C es un virus con envoltura y genoma de ARN que se transmite preferencialmente por vía parenteral. El porcentaje de personas infectadas por el VHC que evolucionan para la forma crónica es alto (55% - 80%). Desde el inicio de los años 90 del siglo pasado se realiza el tamizaje en donantes de sangre para interrumpir esa vía de transmisión.

Las pruebas utilizadas para el tamizaje son inmunoensayos por ELISA, CLIA o e-CLIA, que detectan en su mayoría anticuerpos anti-HCV y en algunos casos también detectan la presencia del Ag core del HCV. En paralelo se recomienda utilizar pruebas NAT-ARN en muestras individuales o en "pool" de 6 muestras para disminuir el riesgo residual de transmisión, principalmente porque acortan el periodo de ventana, que es de cerca de 70 días para los inmunoensayos que detectan anticuerpos y de esta manera se reduce la ventana en alrededor de 12 días. De la misma forma que para el HIV, se recomienda que las pruebas NAT estén direccionadas hacia dos regiones diana independientes.

De acuerdo con la OMS el tamizaje del HCV debería ser realizado en la población en general para identificar el número real de personas infectadas. En ese caso el tamizaje se puede empezar por la detección de anticuerpos anti-HCV por inmunoensayos o pruebas diagnósticas rápidas. Cuando se detecte la presencia de anti-HCV se debe proceder a una prueba molecular (PCR o qPCR) sensible para HCV-ARN, para confirmar el estado de infección.

Pruebas de tamizaje para sífilis (2, 12, 13)

En el diagnóstico y tamizaje de sífilis se utilizan pruebas serológicas indirectas que pueden ser treponémicas (PT) o No-treponémicas (PNT)

Las PNT detectan Reaginas, que no son específicas para sífilis y consisten en una mezcla antigénica estándar de cardiolipina – colesterol – lecitina. La prueba de VDRL requiere la inactivación previa del complemento en las muestras al tiempo que las demás pruebas como la RPR no necesitan la inactivación. En la realización de las PNT se recomienda el uso concomitante de una muestra de suero pura y otra con dilución 1/10, para evitar el efecto pro zona.

Las PT detectan la presencia de anticuerpos específicos IgM e IgG contra el *T.pallidum*, a través de metodologías ELISA, CLIA y e-CLIA, que actualmente presentan alta sensibilidad y alta especificidad.

Aunque durante muchos años se utilizasen las PNT en el tamizaje de donantes de sangre, principalmente porque el costo era menor, hoy en día la recomendación es que se usen PT que son más seguras para evitar la transmisión de *T.pallidum* a los receptores, principalmente en el caso de plaquetas . *Existe el riesgo de transmisión por transfusión de sífilis, cuando el tamizaje se realiza solamente con la PNT de VDRL.*

Pruebas de tamizaje para la enfermedad de Chagas. (14, 15, 16, 17, 18, 19)

El tamizaje de donantes para la enfermedad de Chagas se realiza con pruebas serológicas. Durante muchos años se utilizaron las pruebas convencionales (ELISA, HAI, IFI) para el tamizaje en bancos de sangre. Después los inmunoensayos pasaron a utilizar, como fracciones antigénicas, proteínas recombinantes y/o péptidos sintéticos en sustitución al lisado parasitario y de esta manera mejoraron la sensibilidad y la especificidad. La recomendación de la OMS en 2002 fue que para en el tamizaje en BS se utilizase una única prueba serológica ELISA de alta sensibilidad. En aquella época no existían los inmunoensayos por CLIA / e-CLIA. Hoy en día cualquier inmunoensayo (ELISA, CLIA, e-CLIA) con alta sensibilidad es recomendado para el tamizaje. En Latinoamérica la mayoría de los países utilizan una única prueba en el tamizaje, con excepción de Argentina que recomienda dos pruebas. Existe el riesgo de transmisión por transfusión de *T.cruzi*, cuando la prueba del tamizaje no es lo suficientemente sensible. También se observan variaciones en la reactividad de los Inmunoensayos dependiendo del área geográfica donde se aplican, por lo que se recomienda que las pruebas de tamizaje sean evaluadas con muestras locales antes de la utilización.

Estudios recientes han mostrado que existe una variación geográfica en la distribución de los genotipos del *T.cruzi* y en consecuencia se observan variaciones en la reactividad de los inmunoensayos para detectar anti-*T.cruzi*. Es un punto que debe ser mejor estudiado para entender si el uso de una única prueba serológica para el tamizaje sería suficiente en todas las regiones/países de América Latina. En el caso de diagnóstico de la infección en laboratorio la recomendación continúa siendo el uso de dos pruebas de principios diferentes y cuando los resultados no coinciden está indicado el uso de una tercera prueba. En verdad todavía no se ha encontrado ninguna prueba que pudiese ser

considerada confirmatoria para la infección. Algunas recomendaciones pueden ser útiles para mantener un tamizaje seguro: a) Que los inmunoensayos sean evaluados con paneles de muestras locales; b) Que se utilicen las referencias biológicas para anti-*T.cruzi* de la OMS para verificar la sensibilidad de los inmunoensayos; c) Que se adopten procedimientos estrictos de control de calidad interno y externo en los laboratorios de tamizaje serológico.

Pruebas para el tamizaje molecular. (3, 4, 5, 9, 12,13)

Las pruebas NAT corresponden a una metodología que permite detectar e identificar ácidos nucleicos (ADN / ARN) en muestras biológicas. Tienen alta sensibilidad y especificidad, y permiten reducir significativamente el riesgo de infecciones transmitidas por transfusión porque además de reducir el periodo de ventana para el diagnóstico (PV), también ayudan a detectar variantes virales y en algunos casos consiguen identificar portadores de virus ocultos.

Para el HIV, HCV y HBV, el tamizaje molecular, en paralelo con el tamizaje serológico permite reducir, de forma significativa, el período de ventana de la infección por esos virus. En el caso del HIV, donde se considera que existe un periodo de ventana, en promedio de 22 días, con los inmunoensayos de 3ª generación y de 17-18 días con los inmunoensayos de 4ª generación, se consigue reducir ese periodo en alrededor de 10 días con el NAT-ARN; En general se utilizan mini pools de 6 muestras, lo que permite trabajar con una ventana de 10 -12 días. En caso de utilizar muestras individuales, se consigue una reducción aún mayor en torno de seis a siete días. Es importante considerar que el uso de pruebas NAT permite la reducción del periodo de ventana, pero no lo elimina.

Estudios recientes consideran importante compensar los fallos que puedan ocurrir cuando las pruebas NAT estén dirigidas para una única región diana del HIV-1

Las recomendaciones internacionales para el uso de las pruebas NAT indican que los ensayos NAT cualitativos para el HIV, distintos de los análisis de tipado del virus, estén diseñados para compensar el posible fallo de una región diana de NAT para el HIV-1, por ejemplo, utilizando dos regiones diana independientes.

Las mismas recomendaciones, también orientan en el sentido de que los ensayos NAT cualitativos para el HIV destinados a detectar la presencia del VIH en la sangre, los componentes sanguíneos, las células, los tejidos o los órganos, o en cualquiera de sus derivados, para determinar si son adecuados para transfusiones, trasplantes o suministros de células, estarán diseñados para detectar tanto el HIV-1 como el HIV-2. Para el HCV que tiene un periodo de ventana de 70 días, con los inmunoensayos de 3ª generación se consigue una reducción a 10-12 días con el NAT-ARN. En el caso del HBV, tenemos un periodo de ventana de aproximadamente 59 días cuando hacemos el tamizaje con el Ag HBs que puede ser reducido a 10-12 días con el NAT-ADN.

Las técnicas moleculares más utilizadas son la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la amplificación mediada por transcripción (TMA). La PCR

en tiempo real (qPCR) es más adecuada porque evalúa la amplificación en el momento que está ocurriendo, siendo una prueba cuantitativa más sensible, rápida y precisa. La prueba de TMA utiliza un ciclo continuo de amplificación isotérmico. Por ejemplo, la plataforma COBAS TaqScreen Multiplex Test MPX A de Roche Molecular Systems es cualitativa y permite la detección simultánea de HIV-1 ARN, HIV-2 ARN, HCV ARN y HBV ADN. Otra plataforma Procleix Ultra de Chiron Corporation también es cualitativa y utiliza la reacción TMA y detecta simultáneamente HIV-1 ARN, HCV ARN y HBV ADN.

El control del proceso referente al tamizaje serológico y molecular para enfermedades infecciosas en donantes de sangre, incluye una serie de acciones que deben ser cumplidas para poder garantizar la calidad de los resultados finales.

- a- *Calificación inicial de los kits diagnósticos utilizados:* usando paneles específicos o de desempeño para cerciorarnos de la Sensibilidad y de la Especificidad analíticas. Cuando sea posible usar Paneles de seroconversión para el HIV, HBV y HCV que nos puedan dar una idea de la Sensibilidad clínica o sea del periodo de ventana. Por lo menos que tengamos esa información proveniente de algún ente de referencia. Esas informaciones deben servir de orientación para la aprobación de las pruebas antes de la compra o del inicio de uso en el laboratorio.
- b- *Calibración periódica de equipos / plataformas:* para eso es importante la elaboración de contratos con los fabricantes que estén dentro de las recomendaciones de la gestión de la calidad. Se debe considerar un mantenimiento preventivo que atienda a las necesidades del servicio y también que contemple la realización de mantenimientos correctivos, siempre que sean necesarias.
- c- *Procedimientos de control de calidad:* existen conceptos de Control de Calidad reconocidos internacionalmente para supervisar el desempeño de los laboratorios: Control de Calidad Interno y el Control de Calidad Externo que son diferentes, pero que se complementan.

Evaluación de la Calidad en los laboratorios responsables por el tamizaje serológico y molecular de los donantes de sangre. (2, 22, 23, 24)

Vamos a tomar en cuenta los dos puntos que consideramos más importantes en ese proceso:

- 1- Vigilar que el laboratorio aplique un programa interno de control de calidad. (evaluación de la imprecisión)
- 2- Participar al menos de un programa de evaluación externa de la calidad (PEEC) (evaluación de la inexactitud)

Control de calidad interno

Durante la Ronda Analítica es fundamental vigilar la precisión y la exactitud porque pueden ocurrir eventos adversos que deberán ser detectados de forma adecuada. Para eso se utilizan muestras control para cada analito. El número, la frecuencia y los niveles de las muestras control dependerá del número y de la magnitud de la Ronda Analítica y podrán ser diferentes para equipos manuales o de alimentación continua y para periodos largos de uso.

Para las pruebas cualitativas se utilizan sueros control interno (SCI) de baja reactividad para monitorear las corridas diarias del laboratorio. Los SCI deben ser muestras controles estables y pueden ser reactivas/positivas (SCI+) o no-reativas/negativas (SCI-)

Los SCI (+) deberán presentar un índice de reactividad (lectura/valor de corte) $>1,0$. Se recomienda un rango de reactividad para ese índice entre 2,0 – 4,5.

Para las pruebas competitivas el índice deberá ser $<1,0$ siendo el rango recomendado de 0,3 – 0,7.

Los SCI (-), deberán presentar un índice de reactividad $<1,0$ siendo recomendados valores inferiores a 0,8. Cuando se trate de pruebas competitivas el índice deberá ser $> 2,0$.

Estos valores recomendados para los SCI (+/-) han sido los más utilizados por los laboratorios de tamizaje, en los últimos años en Brasil y en Latino América, pero existe la opción de que el laboratorio determine sus propios límites de reactividad, basado en su experiencia individual, si la misma ha sido bien documentada y cuidadosamente analizada.

Para la aplicación de los SCI en la rutina diaria de los laboratorios es necesario seguir algunas etapas. En primer lugar, verificar si la reactividad del SCI está dentro del rango recomendado. En caso contrario será necesario realizar algún ajuste, o escoger otro SCI. Actualmente existen SCI independientes disponibles en el comercio internacional, que son ajustados para distintos parámetros y metodologías.

Seguidamente se realiza la calibración de cada SCI (+) para cada parámetro y para cada metodología. Se realizan 20 replicados dentro de 4 a 5 días y se calcula la media (M), la desviación estándar (DE) y el coeficiente de variación (CV). En caso de que se observen “valores atípicos” deberán ser eliminados, por ejemplo, usando el test de Grubbs y sustituirlos por otros valores.

Con los valores que se obtienen en la calibración se construye el gráfico de Levey-Jennings (LJ) que consiste en una forma de acompañamiento gráfico de los valores que se obtienen con las corridas diarias. Se considera la media (M) de los valores de la calibración como la línea central y se consideran valores (+) (o hacia arriba o hacia abajo) de uno, dos o tres valores de la desviación estándar (DE).

La manera más fácil de trabajar es transformar los valores de cada determinación de los SCI (+), sea en la calibración, como en la aplicación del día a día, por el Z score a través de la fórmula: **Índice (L/CO) – Media / DE = Z.**

En ese caso el valor de la media en la línea central del gráfico tendrá el valor cero y el valor de Z podrá ser positivo o negativo (+1, +2, +3 y -1, -2, -3).

Se deben insertar en el gráfico de LJ los valores que se observan en cada corrida y se debe hacer un análisis de esos valores diariamente.

Para las pruebas cualitativas se consideran aceptables valores del SCI (+) dentro del rango de la M \pm 3 DE. En general se utilizan las reglas de Westgard: tres reglas de alerta (1 $_{2DE}$; 2 $_{2DE}$; 4 $_{1DE}$) y tres mandatorias (1 $_{3DE}$; 10_x; R $_{4DE}$). Para el SCI (-) no se usan las reglas de Westgard.

Los laboratorios deben definir criterios para establecer el control sobre el uso diario de los SCI para la validación de las corridas. El criterio para aceptar, o no, una corrida debe constar en los POEs de cada laboratorio y en algunas situaciones pueden mostrar diferencias entre los analitos y las plataformas utilizadas. Lo importante es que los criterios establecidos: "Deben ser obedecidos".

Normalmente se acepta la corrida cuando solamente una regla de alerta es violada y se rechaza la corrida cuando solo una regla mandatoria es violada.

El análisis diario, usando las reglas de Westgard, permite obtener diversas informaciones como tendencias (4 $_{1DE}$, 10_x), dispersión (1 $_{2DE}$, 1 $_{3DE}$, R $_{4DE}$) o cambios que pueden ser repentinos o debido a la introducción de nuevos lotes de reactivos. Cuando el cambio de lotes de reactivos da origen a alteraciones en el comportamiento de los SCI, será necesario hacer una nueva calibración de esos SCI.

Hoy en día la mayoría de los laboratorios utilizan equipos/plataformas de alimentación continua, que poseen softwares internos que controlan las rutinas, incluso utilizando los gráficos de Levey-Jennings. Las orientaciones de los fabricantes deben ser respetadas. Al mismo tiempo es importante que cada laboratorio aplique sus controles internos diariamente y verifique el comportamiento de los mismos. También es importante establecer los períodos en que los SCI deben ser introducidos en los equipos. La frecuencia puede variar entre equipos, parámetros, marcas comerciales y metodologías. Cuando se usan plataformas de alimentación continua en corridas analíticas de larga duración es aconsejable verificar los periodos adecuados para insertar nuevos SCI.

Control de calidad Externo

La forma más común de control de calidad externo (CCE) son los llamados programas de comparación entre laboratorios o programas de evaluación externa de la calidad (PEEC) o EQAS (External Quality Assessment Schedule).

Es común que los PEEC sean obligatorios, y los laboratorios participantes deban obtener resultados aceptables para poder ejercer sus actividades, o para evitar sanciones o para poder lograr un determinado "status". En este caso, el CCE o PEEC se denomina Prueba o Ensayo de Aptitud. La participación en uno o más PEEC, es requisito indispensable para la acreditación de un laboratorio. Eso

significa que los LP deben tener un desempeño aceptable como condición necesaria para obtención de las acreditaciones.

El principal objetivo de todo programa de control de calidad externo es la evaluación continuada y a largo plazo del Error Sistemático (ES) de los procedimientos de medida como complemento indispensable del control interno de la calidad. Además, cuando los LP aprovechan todos los datos generados en los programas, se puede obtener información sobre el funcionamiento de las tres fases analíticas del laboratorio.

Tenemos que llevar en consideración que los inmunoensayos utilizados en el tamizaje de donantes son pruebas cualitativas que detectan si el parámetro investigado está presente o ausente. El único referencial aceptable para el análisis de los resultados es el Cut off (valor de corte) Se utiliza un índice que representa el valor de lectura dividido por el Cut off para definir si la muestra es reactiva o no-reactiva. El mejor valor de corte para un inmunoensayo será aquel que consiga separar más claramente el conjunto de resultados verdaderamente positivos del conjunto de resultados verdaderamente negativos. Para algunos parámetros/metodologías, esa separación a veces no es clara y entonces se puede establecer la llamada “zona gris” que corresponde a un porcentaje de 10% o más alrededor del valor de corte. Resultados con valores dentro de esa zona deben ser repetidos.

Los PEEC son desarrollados por un centro organizador que muchas veces es un proveedor fiable y en algunos casos son desarrollados por entidades gubernamentales. Los organizadores de los programas deben atender a las recomendaciones de las normas: ISO 17.034 e ISO/IEC 17.043. **(Fig. 3)**

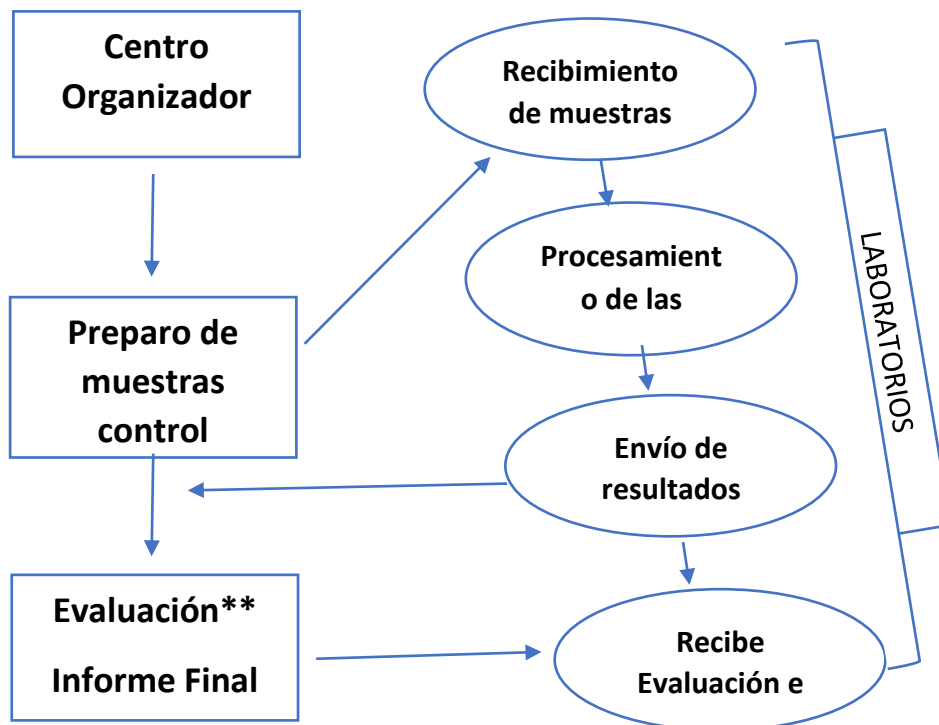


Figura 3. Programas de evaluación externa de la calidad (PEEC) o ensayos de Aptitud; Requisitos: (*) competencia de los productores de muestras de referencia y requisitos para los ensayos de aptitud: ISO 17.034 y ISO/IEC 17.043. (**) Requisitos para la calidad de los laboratorios clínicos: ISO 15.189.

El proveedor de los programas debe preparar muestras control, muy bien caracterizadas, para que puedan ser usadas como referencia. Algunos proveedores producen sus propias muestras control al paso que otros utilizan muestras de otros fabricantes. Lo importante es que se deben utilizar muestras control optimizadas e imparciales que puedan garantizar la homogeneidad y la exactitud de la evaluación.

Esas muestras, formando paneles, son enviadas a los LP que deben procesarlas como si fueran muestras de su rutina diaria y enviar los resultados obtenidos al Proveedor dentro del plazo previamente establecido. El reporte adecuado de los resultados debe ser dentro de las primeras 72 horas para que se puedan aplicar medidas que sean necesarias. Es importante que los paneles usados en los PEEC contengan muestras positivas y negativas para todos los parámetros del tamizaje.

Después de haber recibido los resultados de los participantes, el proveedor, tras un análisis cuidadoso, debe preparar la evaluación individual para cada uno de los participantes, que será confidencial, y al mismo tiempo preparar un informe final con los datos de todos los LP, de modo a permitir que cada laboratorio pueda ubicarse en el contexto general de los demás participantes. En ese informe debemos encontrar el número total de participantes, con sus estrategias y metodologías utilizadas, y también de las marcas comerciales. Vamos a encontrar el total de resultados correctos, o los RFR y RFNR por metodología y por marca de reactivos. Los inmunoensayos utilizados en la caracterización de las muestras deberán constar del informe final, así como los resultados de cada uno de ellos. Todos los trámites y documentos generados en el programa deberán ser enviados por medio del sitio de la web del proveedor, eliminando totalmente el intercambio de informaciones en papel.

Es muy importante que los LP verifiquen atentamente las evaluaciones individuales y al mismo tiempo lean cuidadosamente los informes finales para aprovechar todas las informaciones enviadas. En el caso que se observen no-conformidades, estas deben ser registradas y tratadas adecuadamente, así como las medidas correctivas o preventivas que sean adoptadas.

Es fundamental que los proveedores responsables de los programas de control de calidad externo, desarrollen programas de educación continuada que contengan temas de interés y actualizados sobre enfermedades transmisibles por transfusión y también sobre temas actuales de interés en salud pública.

Aunque ese tema todavía no esté bien definido en las normas internacionales, consideramos que la frecuencia de los PEEC debe ser mensual, como mínimo y que se utilicen muestras control optimizadas e imparciales que puedan garantizar la homogeneidad y la exactitud de la evaluación.

El análisis de PEECs consecutivos mensuales, ha mostrado que todos los meses se observa algún tipo de no conformidad, lo que refuerza la necesidad de que la frecuencia sea mensual.

Recomendaciones finales sobre los procedimientos de control de calidad

Documentar e investigar las causas de las No conformidades observadas en los PEEC (RFR y/o RFNR), con la participación de todos los profesionales del LP, aplicando las herramientas de la calidad. Las causas encontradas, así como las medidas correctivas o preventivas adoptadas deberán ser documentadas y registradas.

Los SCI deben ser aplicados diariamente en todas las corridas del laboratorio y el análisis de los resultados también debe ser diario, para poder validar las corridas. Se deben usar los criterios previamente establecidos para aceptar o rechazar las corridas.

Todos los procedimientos de Control de calidad son muy útiles para mantener la calidad de los resultados liberados por el laboratorio, pero hemos de tener en cuenta que para que eso ocurra debe existir algún mecanismo externo para auditar los procedimientos y verificar si los procesos o servicios se ejecutan de acuerdo con los requisitos especificados y si los resultados son satisfactorios.

Referencias bibliográficas recomendadas.

- 1- Agência Nacional de Vigilância Sanitária [ANVISA]. (2014). Resolução RDC nº 34 de 11 de junho de 2014. Anvisa.
- 2- Brasil Ministério da Saúde portaria nº 158, de 04 de fevereiro de 2016; dou de 05/02/2016 (nº 25, seção 1, pág. 37)
- 3- Bush MP, Bloch EM and Kleinman S., Blood 25 APRIL 2019 | VOL 133, Number 17 1854-1864.
- 4- PAHO.https://www3.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=1498:2009-blood-from-heart-safest-blood&Itemid=0&lang=es#gsc.tab=0
- 5- Diagnostico da infecção pelo HIV; 2018. <www.saude.gov.br/bvs>
- 6- WHO; Consolidated guidelines on HIV testing services, 2019 <https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwji8O63itD8AhU8GLkGHe6EBocQFnoECA8QAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.who.int%2Fpublications-detail-redirect%2F978-92-4-155058-1&usq=AOvVaw1uKAm31bOjd-DxQ9FDfYzS>
- 7- Afonso PV, Cassar O & Gessain A.. Molecular epidemiology, genetic variability and evolution of HTLV-1 with special emphasis on African genotypes; Retrovirology (2019) 16:39 <https://doi.org/10.1186/s12977-019-0504-Z>.
- 8- Nakano K & Watanabe T, Tuning Rex rules HTLV-1 pathogenesis. Front. Immunol., 16 September 2022 Sec. Viral Immunology <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.959962>
- 9- Nishiya AS, Levi JE, Almeida-Neto C, Witkin S, Ferreira S et al. Occult and active hepatitis B virus detection in donated blood in São Paulo, Brazil. Transfusion. 2021; 61/5; 1495-1504. DOI: 10.1111/trf.1634

- 10-Rocha D, Andrade E, Godoy DT, Fontana-Maurell M et al. The Brazilian experience of nucleic acid testing to detect human immunodeficiency virus, hepatitis C virus, and hepatitis B virus infections in blood donors. *TRANSFUSION*. 2018;58:862–870
- 11-Decisión de ejecución (UE) 2019/1244.
<https://www.google.com.br/url?sa=t&rct=j&q=&esrc=s&source=web&cd=&cad=rja&uact=8&ved=2ahUKEwjlr-24i9D8AhXzK7kGHWu6BL0QFnoECAwQAQ&url=https%3A%2F%2Fwww.cde.ual.es%2Fficha%2Fdecision-de-ejecucion-ue-2019-1244-de-la-comision-de-1-de-julio-de-2019-por-la-que-se-modifica-la-decision-2002-364-ce-en-lo-que-concierne-a-los-requisitos-de-las-pruebas-combinadas-de-deteccion-d%2F&usg=AOvVaw2zp1PM4tV8y5BRvXcqNzMp>
- 12-Attie A, de Almeida-Neto C, S. Witkin S, et al. Detection and analysis of blood donors seropositive for syphilis. *Transfusion Medicine*. 2021;1–8.
- 13-Sáez-Alquezar A, Albieri D, Garrini RHC, Marques WP, Lemos EA and Alves A. Desempenho de testes sorológicos para sífilis, treponêmicos (ELISA) e não treponêmicos (VDRL e RPR), na triagem sorológica para doadores de sangue – confirmação dos resultados por meio de três testes treponêmicos (FTA ABS, WB e TPHA Ver Patol Tropical, Vol. 36 (3): 215-228. set.-dez. 2007.
- 14-Forsyth J, Manne-Goehler J, Bern C, Whitman J, Hochberg NS et al., Recommendations for Screening and Diagnosis of Chagas Disease in the United States *JID* 2022;225 (1 May): 1601-1610
- 15-Sáez-Alquezar A, Junqueira A C V, Durans AM, Guimarães AV, Corrêa JÁ et al. Application of WHO International Biological Reference Standards to evaluate commercial serological tests for chronic Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 2020; 115: e200214. Epub July 24, .
<https://doi.org/10.1590/0074-02760200214>
- 16-Sáez-Alquezar, A, Junqueira ACV, Guimarães AV, Corrêa JÁ, Borges-Pereira J et al; Geographical origin of chronic Chagas disease patients in Brazil impacts the performance of commercial tests for anti-T. cruzi IgG *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 116: e210032, 2021
- 17-Schijman AG, Alonso-Padilla J, Loncghi SA and Picado A.. Parasitological, serological and molecular diagnosis of acute and chronic Chagas disease: from field to laboratory. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, 2022, Vol. 117: e200444
- 18-Truyens C, Dumonteil F, Açger J,Cafferata ML, Ciganda A , et al.: Geographic Variations in Test Reactivity for the Serological Diagnosis of *Trypanosoma cruzi* Infection. *Journal of Clinical Microbiology*; December 2021 Volume 59 Issue 12 e01062-21
- 19-Zingales B. & Bartholomeu DC.; *Trypanosoma cruzi* genetic diversity: impact on transmission cycles and Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 117: e210193, 2022
- 20-Hourfar K, Eberle J, Müller M, Nübling CM, Chudy M,et al; Human Immunodeficiency virus 1 dual-target nucleic acid technology improves

- blood safety; 5 years of experience of the German Red Cross blood donor service Baden-Württemberg–Hessen ; *Transfusion* 2018; 58: 2886-2893.
- 21-Roth WK, History and Future of Nucleic Acid Amplification Technology Blood Donor Testing. *Transfus Med Hemother* 2019; 46:67–75. DOI: 10.1159/000496749
- 22-Dubey A & Sonker A. Implementation of internal quality control program for monitoring of enzyme-linked immunosorbent assay performance at a blood center. *Asian J Transfus Sci* 2021; 15:21-9.
- 23-Sáez-Alquezar A, Albajar-Viñas P, Guimarães AV, Corrêa JA. Quality Control in Screening for Infectious Diseases at Blood Banks. Rationale and Methodology. *EJIFCC*. 2015 nov 27;26(4):278-85. PMID: 27683500; PMCID: PMC4975364.
- 24-Westgard J, Mercapide L, Sáez-Alquezar A, Porrás A, Martínez O, Amaya E, Iturriza M, Mendoza E, Brambila E & Terrés A. Como garantizar la calidad analítica. *Rev Mex Patol Clin*.2010; vol 57(4): 179-189;