

ESTÁNDARES DE CALIDAD PARA LABORATORIOS QUE REALIZAN PRUEBAS DE INMUNOGENÉTICA PARA TRASPLANTE DE ÓRGANOS

28 de noviembre de 2013
Colombia

1

ESTÁNDARES DE CALIDAD PARA LABORATORIOS QUE REALIZAN PRUEBAS DE INMUNOGENÉTICA PARA TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Instituto Nacional de Salud

Lynda Prieto¹, Maria Angelica Salinas², Yazmin Rocio Arias³

Universidad de Antioquia

Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de Medicina

Libia María Rodríguez⁴, Mabel Cristina Giraldo⁵, Diego Mauricio Suárez⁶, Luis
Fernando García⁷, Cristian Mauricio Álvarez⁸

¹ Subdirectora Gestión Calidad. Dirección Redes en Salud Pública. Correo Electrónico: lprieto@ins.gov.co

² Coordinadora Grupo Red Donación y Trasplantes. Dirección Redes en Salud Pública. Correo Electrónico: msalinas@ins.gov.co

³ Profesional Especializado Grupo Red Donación y Trasplante. Dirección Redes en Salud Pública. Correo Electrónico: yarias@ins.gov.co

⁴ Bact, M.Sc. Epidemiología Correo Electrónico: libima77@gmail.com

⁵ Bact, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, mabelcristinag@gmail.com

⁶ Adm. Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, documentosdiego@gmail.com

⁷ MD, M.Sc. Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, lfgarcia@udea.edu.co

⁸ Bact, Dr Sc, Director Técnico Científico, Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, cristianma@medicina.udea.edu.co

ESTÁNDARES DE CALIDAD PARA LABORATORIOS QUE REALIZAN PRUEBAS DE INMUNOGENÉTICA PARA TRASPLANTE DE ÓRGANOS

Instituto Nacional de Salud

**Universidad de Antioquia
Grupo de Inmunología Celular e Inmunogenética, Facultad de
Medicina**

MESAS DE TRABAJO LABORATORIOS DE INMUNOGENETICA

**Centro de Diagnostico Especializado Universidad del Norte
Centro Médico Imbanaco de Cali S.A
Laboratorio de Biología Molecular e Inmunología de Trasplantes Fundación Valle de Lili
Laboratorio de Genética y Biología Molecular
Laboratorio de Inmunogenética DIME Clínica Neurocardiovascular
Laboratorio de Inmunología de Trasplantes Hospital Universitario San Vicente Fundación
Laboratorio de Inmunología y Biología Molecular Universidad Industrial de Santander
Laboratorio Especializado Clínica Colsanitas S.A
Laboratorio Genómico Universidad Sur Colombiano
Laboratorio Médico Echavarría
Servicios Médicos Yunis Turbay**

TABLA CONTENIDO

GENERALIDADES	6
LINEAMIENTOS TECNICOS PARA LABORATORIOS	8
1. INSTALACIONES Y CONDICIONES AMBIENTALES	8
1.1 Áreas de Trabajo:	8
2. EQUIPOS:	11
2.1 Equipos.....	11
2.2 Mantenimiento de equipos	11
2.3 Aseguramiento Metrológico:.....	13
3. TALENTO HUMANO	14
4. BIOSEGURIDAD.....	15
5. REACTIVOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS	15
5.1 Condiciones Basadas en legislación nacional.	15
5.2 Condiciones de acuerdo a estándares internacionales.....	16
6. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:.....	17
6.1 Toma y recepción de muestras	18
6.2 Procesamiento de muestras:.....	20
6.3 Realización del ensayo.....	20
6.4 Informe o reporte de resultados:	21
6.5 Registros internos de trabajo	22
6.6 Aseguramiento de la Calidad de los resultados.....	23
7. EVALUACION DE SERVICIO AL CLIENTE.....	23
8. AUDITORÍA.....	24

9. REFERENCIAS	24
ANEXO 1	25
ANEXO 2	27

GENERALIDADES

Los siguientes lineamientos comprenden un grupo de requisitos para los laboratorios que realizan pruebas de Inmunogenética para trasplantes, con el fin de lograr que se trabaje cumpliendo los estándares internacionales definidos para los laboratorios de Inmunogenética, además de facilitar y mejorar la gestión de la Red de Donación y Trasplantes, siendo estos laboratorios un elemento fundamental de la misma.

El Instituto Nacional de Salud, como coordinador de la Red de Donación y Trasplantes de acuerdo con los Decretos 2493 de 2004, 2274 de 2012 y en atención a la necesidad de definir estándares de calidad para los laboratorios de Inmunogenética para trasplantes, realizó una amplia revisión técnica y normativa que permitió generar una herramienta para los laboratorios participantes en la Red.

Estos lineamientos se construyeron, desde el punto de vista técnico con asesoría de la Universidad de Antioquia, a través de un convenio de cooperación; por otra parte se contó con la participación de los laboratorios de Inmunogenética de las IPS trasplantadoras de órganos del país, que participaron activamente a través de reuniones técnicas, lo anterior permitió establecer acuerdos de manejo y consensos frente a temas específicos y de competencia en el área de interés.

Este documento se fundamenta en los estándares internacionales de la Federación Europea de Inmunogenética (EFI, European Federation for Immunogenetics), la Sociedad Americana de Histocompatibilidad e Inmunogenética (ASHI, American Society for Histocompatibility and Immunogenetics) en la Resolución 1441 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social y en la norma NTC ISO IEC 17025:2005; y aplica para todos los laboratorios de Inmunogenética que realizan pruebas para trasplantes de órganos, existentes en el territorio nacional.

Por otro lado, de manera obligatoria los Laboratorios de Inmunología de Trasplantes deben certificar su existencia legal de acuerdo a las normas colombianas y contar con un representante responsable de los resultados emitidos, para la prestación de este servicio. Deben estar inscritos en la Red Nacional de Trasplantes regida por el decreto 2493 de 2004 y la resolución 2640 de 2005, a través de la IPS a la que le ofrece el servicio de inmunogenética en trasplantes, de igual forma deben cumplir

con las normas correspondientes emitidas por el Ministerio de Salud y Protección Social y demás disposiciones que tome la Secretaria de Salud respectiva del ente territorial donde se ubica el laboratorio u otras entidades competentes. Así mismo, cada laboratorio debe estar inscrito en el Registro Especial de Prestadores de Servicios de Salud y cumplir con los estándares de calidad definidos en el Sistema Obligatorio de Garantía de Calidad de la Atención de Salud del Sistema General de Seguridad Social en Salud (Decreto 1011 de 2006, resolución 1441 de 2013 y demás normas vigentes).

Los laboratorios que realicen pruebas para inmunología de trasplantes están considerados como laboratorios de alta complejidad porque deben contar con recurso humano especializado, tecnología avanzada e infraestructura física requerida para realizar exámenes de baja, mediana y alta complejidad dirigidos a apoyar el desarrollo de los trasplantes de órganos y tejidos mediante una óptima selección de donantes y receptores:

Los ensayos realizados por los Laboratorios de Inmunología de Trasplantes son:

ENSAYOS	GRADOS DE COMPLEJIDAD		
	BAJO	MEDIANO	ALTO
Clasificación Sanguínea	X	-	
Clasificación HLA Clase I y II	-	-	X
Determinación de aloanticuerpos	-	-	X
Determinación de Anticuerpos Reactivos contra Panel (PRA)	-	-	X

Para el correcto desempeño de sus actividades, el laboratorio debe asegurar como mínimo las condiciones descritas en el presente documento.

LINEAMIENTOS TECNICOS PARA LABORATORIOS DE INMUNOGENETICA EN TRASPLANTE DE ORGANOS

1. INSTALACIONES Y CONDICIONES AMBIENTALES

Teniendo en cuenta el flujo de la muestra y los estándares definidos en la resolución 1441 de 2006, se deben tomar medidas que eviten al máximo una contaminación cruzada que pueda generar resultados no válidos. Las medidas pueden incluir restricciones de acceso, rutas de manejo de residuos y horarios de trabajo de transporte de muestra.

Se debe establecer un flujo de la muestra de tal manera que su transporte, almacenamiento, manejo, y disposición final no afecte la calidad del ensayo.

1.1 AREAS DE TRABAJO:

El laboratorio deberá tener las áreas separadas e identificadas, lo cual se debe tener independientemente de si se trata de un laboratorio clínico exclusivo para inmunología de trasplantes o si hace parte de otra institución mayor. Debe considerarse un área administrativa, un área técnica, y un área de servicios generales (opcional).

AREA ADMINISTRATIVA:

El área administrativa de los laboratorios debe estar separada del área técnica e incluirá las siguientes subáreas:

- Sala de espera: Se debe disponer de una sala de espera adecuada con sillas suficientes la cual puede ser compartida con otros servicios.
- Recepción: Se debe contar con un área independiente, donde el personal reciba inicialmente a los pacientes y se suministre información necesaria.

- Área de dirección: Debe existir un área en el laboratorio para dirigir las actividades técnicas y administrativas.

AREA TECNICA

El área técnica de los laboratorios incluirá las siguientes subáreas, entre otras:

- Toma de muestras: Debe existir un área dedicada exclusivamente para la toma de muestras que esté dotada para tal fin.
Debe contar mínimo con un baño, y lavamanos que puede ser compartido con otros servicios.
- Área de procesamiento de muestras: Todas las áreas de procesamiento de muestras de laboratorio de alta complejidad deben contar con los equipos, y recursos necesarios para la realización de los ensayos. Todos los materiales biológicos deben manipularse como material potencialmente infeccioso y por tanto se debe seguir estrictamente las normas de bioseguridad.

En la realización de las pruebas inmunológicas para trasplantes es importante el cumplimiento de las políticas de acceso y utilización de áreas ya que en los procedimientos se pueden generar problemas de contaminación cruzada. Con el fin de evitar este tipo de problemas, se deben delimitar zonas específicas para el procesamiento de las muestras, contando así con áreas para realizar las siguientes actividades:

- Área de extracción de ADN: Procesamiento de las muestras para el aislamiento del ADN.
- Área de Inmunología: Procesamiento de muestras para la realización de clasificaciones sanguíneas, determinación de auto, aloanticuerpos y anticuerpos reactivos contra panel (PRA).
- Área PCR: Preparación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes de histocompatibilidad.

- Área Post-PCR: Manipulación de los productos amplificados, electroforesis y revelado. Es posible un área de revelado independiente siempre y cuando la técnica lo requiera.

En todos los casos se deberán tener medidas de orden y limpieza del laboratorio que estén debidamente documentadas y el resultado de la evaluación de la eficacia de estas medidas esté registrado.

El flujo de trabajo de las áreas de pre- PCR, PCR y Post-PCR debe ser unidireccional con el fin de evitar la contaminación cruzada y garantizar la calidad en el proceso.

ÁREA DE SERVICIOS GENERALES:

El área de servicios generales de los laboratorios incluirá las siguientes subáreas, entre otras:

- Lavado de material-esterilización: Debe existir un área de lavado de material y esterilización (si aplica), ubicada independientemente del resto de las áreas técnicas.
- Servicios sanitarios: Debe contar con servicios sanitarios y lavamanos.
- Área de aseo: Se debe contar con un área para almacenar el material de aseo y de limpieza. La cual debe estar dotada con pocetas para el lavado del material de aseo. Se debe contar con un protocolo de limpieza y desinfección de las áreas y del material de vidrio.
- Almacenamiento de reactivos y suministros: Es necesario disponer de un depósito de materiales y reactivos independiente dotado con estantería adecuada para el almacenamiento.
- Área de almacenamiento y manejo de residuos: Debe existir un área específica para el almacenamiento de residuos con iluminación y ventilación adecuadas, cubierta para protección de aguas lluvias, con acceso restringido y con adecuada señalización. Las paredes deben ser lisas de fácil limpieza y lavables.

Debe tenerse en cuenta la prohibición del uso e instalación de ductos con el propósito de evacuar por ellos los residuos sólidos. (Resolución 04445 de 1996 y la Resolución 05042 de 1996).

CONDICIONES AMBIENTALES

- El laboratorio debe contar con suficiente y adecuada iluminación natural y/o artificial en todos los sitios de trabajo que permitan la realización del ensayo sin dificultades. Y debe contar con ventilación natural y/o artificial que permita al analista – microbiólogo bacteriólogo realiza el trabajo con condiciones mínimas de comodidad y que permitan una adecuada recirculación del aire.
- TEMPERATURA: La temperatura deberá estar entre (15 - 25) grados centígrados. Se realizará monitoreo a través de controles bien sea físicos o electrónicos que permitan evidenciar el comportamiento de la temperatura en función de tiempo. Para el rango de temperatura se deben tomar aspectos como, los requisitos del protocolo de ensayo, los requisitos de los equipos o la establecida por el fabricante para el almacenamiento de los reactivos.

2. EQUIPOS:

2.1 EQUIPOS

Se deben utilizar los equipos que cuenten con las condiciones técnicas de calidad y soporte técnico - científico. Todos los laboratorios clínicos deberán tener los equipos Manuales, semi-automatizados o automatizados necesarios para los procedimientos que realicen (Resolución 1441 de 2013).

Los equipos solo deben ser utilizados por personal autorizado por escrito que hayan cumplido con un entrenamiento suficiente, cuyo tiempo de entrenamiento depende de la complejidad del equipo.

2.2 MANTENIMIENTO DE EQUIPOS

Todos los equipos utilizados en el laboratorio deben cumplir con las especificaciones y estándares internacionales para la realización del ensayo en que será utilizado y por tal razón se debe velar por mantener su correcto funcionamiento.

- El mantenimiento de estos equipos debe realizarse por profesional en áreas relacionadas o técnicos con entrenamiento certificado específico o puede ser contratado a través de proveedor externo.
- Cada instrumento o equipo crítico debe tener una hoja de vida que comprenda como mínimo la siguiente información: nombre del fabricante y/o distribuidor o proveedor, número de modelo, número de serie, número de inventario, fecha de compra, localización, dirección y número telefónico del fabricante y/o distribuidores o proveedores, rangos de medición, tolerancias, y condiciones especiales de trabajo.
Nombre, dirección, y número telefónico de la compañía que suministra servicios de mantenimiento preventivo y correctivo, número telefónico de la persona que provee el servicio, fechas que cubren las garantías y los contratos de servicio de mantenimiento.
- Se debe contar con los instructivos de utilización de los equipos en los lugares de utilización para su correcta manipulación. Esta información es necesaria para que el personal pueda identificar correctamente cada equipo y para determinar el estado actual de cada uno, lo que facilita el mantenimiento preventivo y/o correctivo de los mismos.
- **Mantenimiento Correctivo:** El laboratorio debe asegurar la permanente disposición de los equipos, evitando al máximo la probabilidad de interrupciones en el trabajo. Por esta razón debe contar con una sistemática para la realización oportuna de mantenimientos correctivos, para ello se debe:
 - Identificar y marcar los equipos involucrados en las pruebas que presentan daños o fallas.
 - Registrar el daño o falla del equipo y llevarlo a su hoja de vida. El equipo se debe poner fuera de servicio y marcarse como tal, mientras recobre las características normales de funcionamiento

- Solicitar el servicio de reparación al proveedor correspondiente.
 - Asegurar que el desplazamiento del equipo, en caso de salida del laboratorio, no afectará su parte física. En el momento de recepción después de reparado se debe revisar su correcto funcionamiento antes de volver a utilizarse.
 - Guardar copia de cada reporte de mantenimiento y llevarlo a la hoja de vida del equipo.
 - Determinar, cuando sea posible, la causa del daño para tomar medidas preventivas que garanticen el adecuado funcionamiento del equipo y así evitar que se repitan los mismos problemas.
- Los equipos solo pueden ser ajustados por personal autorizado del laboratorio o por el proveedor respectivo.
 - Mantenimiento Preventivo: Para salvaguardar los equipos de ajustes que puedan invalidar las pruebas; se deben realizar un programa anual de mantenimiento preventivo de los instrumentos y equipos, coordinando las tareas de los profesionales y técnicos, para poder cumplir con los controles y el mantenimiento sin afectar el trabajo de rutina.

El mantenimiento preventivo no incluye reparaciones al equipo o instrumentos, sino aquellos pasos necesarios para mantener el equipo continuamente en buen estado de funcionamiento y debe ser planeado de acuerdo a las características particulares de cada equipo del laboratorio.

2.3 ASEGURAMIENTO METROLOGICO:

Se debe confirmar que las características operacionales de un equipo específico se encuentren dentro de los límites aceptables. Las siguientes son las posibles opciones para cumplimiento de esta parte:

- Calibración del equipo: Según periodicidad establecida técnicamente por el proveedor del equipo o por el Laboratorio. La empresa o la persona que realice

la calibración, debe en lo posible demostrar que ha sido evaluado en su competencia por un organismo autorizado para esto.

- Seguimiento periódico del equipo: Los equipos que deban cumplir con una característica controlada (masa, longitud de onda, etc.), deben revisarse constantemente. El período de tiempo definido es importante, pues la comprobación de la operatividad se debe hacer a intervalos apropiados, para tomar las medidas correctivas o preventivas del caso. La frecuencia de los seguimientos depende del uso específico del instrumento, del patrón de uso del instrumento, de la carga de trabajo, de las condiciones ambientales a que está sometido, y de los exámenes que en él se realizan. Adicionalmente, se debe llevar un seguimiento permanente de los equipos como neveras, congeladores, incubadoras, baños maría, etc.

3. TALENTO HUMANO

Debe establecerse un documento por escrito donde se explique el procedimiento sistemático para la selección, inducción y entrenamiento del personal nuevo. Una vez entrenado el personal debe ser evaluado, y antes de comenzar a prestar el servicio, se le debe entregar su respectiva autorización por escrito para la realización pruebas de laboratorio, participación en turnos de trasplante, manipulación de equipos específicos, comunicación con personal de instituciones trasplantadoras y emisión de conceptos e interpretaciones. Por otro lado se deben establecer procedimientos para la evaluación del personal del laboratorio y especificar qué actividades de formación o reentrenamiento se consideren necesarias con base en dicha evaluación.

En caso de requerirse personal de apoyo por fuera del personal vinculado al laboratorio, debe cumplir también con los requisitos definidos para el cargo y debe cumplir con los procedimientos de entrenamiento, evaluación y autorización definida para el personal vinculado.

4. BIOSEGURIDAD

Es el conjunto de normas y procedimientos que garantizan el control de los factores de riesgo, tanto químicos, físicos, orgánicos, psicológicos, ambientales, biológicos, de salud ocupacional, ergonómicos y de seguridad, los cuales atentan contra la salud de las personas que trabajan en un laboratorio. La bioseguridad en el laboratorio se basa esencialmente en la prevención de condiciones que puedan resultar en lesiones al personal ó en daños a las instalaciones del laboratorio que pueden causar accidentes.

El laboratorio debe tener en cuenta la Evaluación y Mitigación de los riesgos biológicos y la vigilancia del Desempeño de un sistema sustentable lo cual debe quedar documentado en el Manual de Bioseguridad.

En el laboratorio se debe implementar el plan de Gestión Integral de Residuos Hospitalarios (PGIRH) y realizar los procedimientos de acuerdo al manual de Bioseguridad, según lo dispuesto en los Decretos 2676 del 2000 del Ministerio del Medio Ambiente, 4126 de 2005 y la Resolución 01164 de 2002 y las demás normas que los adicionen, modifiquen o sustituyan.

5. REACTIVOS Y DISPOSITIVOS MÉDICOS

5.1 CONDICIONES BASADAS EN LEGISLACION NACIONAL. (Resolución 1441 de 2013).

Es importante que se mantengan y se verifiquen en todo momento las correctas condiciones de los reactivos y dispositivos médicos utilizados, para lo cual, se deben cumplir con registros que permitan seguir la trazabilidad, tal como sigue a continuación:

- Selección de insumo requerido con base en lo determinado en el procedimiento o protocolo que se sigue para la realización del ensayo.

- Selección de proveedor, que cumpla con la normatividad del INVIMA para ofrecer los insumos requeridos y que ofrezca productos con las características solicitadas
- Proceso de compra, Debe estar descrito como se hace el proceso de compra de cada producto.
- Recepción: Deben dejarse registros de la recepción de los productos y de la verificación de sus condiciones en el momento de llegada. Para ello, se debe registrar la fecha de llegada, la cantidad recibida, condiciones del producto y responsable de recepción. En caso de encontrar alguna irregularidad con respecto a las condiciones de llegada del reactivo y/o suministro informar inmediatamente al proveedor y registrarlo.
- Almacenamiento: Los productos deben ser almacenados en las condiciones ambientales y de bioseguridad que sean determinados por el fabricante y por la normatividad internacional.
- Control de inventarios: hacer vigilancia de fechas de vencimiento y de cantidades, de tal manera que no se produzcan problemas para la continuidad del servicio en ningún momento.
- Uso: Describir las condiciones en las que debe ser utilizado el reactivo en cada ensayo, ej: atemperar en cantidad de tiempo, apagado de luces para su utilización, etc.
- Disposición final: Describir cómo se va a realizar la disposición final de cada producto, por ejemplo, protocolos de inactivación, incineración, etc. Realizar la adecuada disposición de los reactivos de acuerdo a su naturaleza química y con base en las recomendaciones del proveedor y las autoridades ambientales. Se deben retirar los reactivos y/o suministros que salgan de circulación por cambio de técnica o que se encuentren vencidos.

5.2 CONDICIONES DE ACUERDO A ESTÁNDARES INTERNACIONALES:

- Los reactivos, soluciones, materiales de referencia y todos los suministros deben ser etiquetados indicando la identidad, la titulación y concentración (cuando sea pertinente), condiciones de almacenamiento, fecha de preparación y vencimiento (si aplica) (ASHI numeral D.4.1.3.1, EFI numeral C4), código dependiendo del riesgo que representen para la salud y el medio ambiente, y otra información que sea pertinente para su uso.

- Los reactivos químicos se deben almacenar de acuerdo a la clasificación de riesgo.
- Almacenar a temperaturas adecuadas los reactivos biológicos. Si el almacenamiento se efectúa en neveras y congeladores, se debe realizar diariamente control de temperatura (EFI numeral C1.2).
- Las condiciones de almacenamiento deben ser monitoreadas y documentadas (ASHI numeral D.4.1.2).
- Se debe tener un sistema documentado para identificar que lote de reactivos fue usado en un ensayo (ASHI numeral D.4.1.3.3).
- Antes de reportar un resultado de un ensayo realizado con reactivos de un nuevo lote se debe verificar y documentar el desempeño satisfactorio del nuevo lote (ASHI numeral D.4.1.3.5).
- Componentes de estuches de reactivos de diferentes lotes no deben ser intercambiados a menos que sea especificado por el fabricante (ASHI numeral D.4.1.3.6).
- Si se utilizan estuches comerciales, se deben seguir las instrucciones del fabricante, a menos que el laboratorio haya realizado y documentado pruebas de validación que justifiquen una desviación en la técnica o en el análisis (ASHI numeral D.4.1.3.7).

6. MANUAL DE PROCEDIMIENTOS:

Los laboratorios de Inmunología de trasplantes deben:

- Garantizar la utilización de métodos de ensayo normalizados y validados internacionalmente los cuales han sido editados en normas internacionales y por organizaciones técnicas reconocidas (American Society for Histocompatibility and Immunogenetics (ASHI), European Federation for Immunogenetics (EFI), y talleres internacionales de histocompatibilidad).

- En caso que el Laboratorio utilice un método propio o modifique el método definido internacionalmente, debe realizar un proceso de validación o confirmación del método o de las modificaciones, lo cual debe estar lo suficientemente documentado para demostrar su aplicabilidad.
- Se debe garantizar que los documentos utilizados se encuentran vigentes y, se debe definir, como se controlan los documentos obsoletos para que no sean utilizados involuntariamente.
- Establecer un manual o manuales de los procedimientos técnicos realizados en el laboratorio. No es aceptable el uso de insertos de productos provistos por el fabricante como reemplazo del manual de procedimientos.
- Se debe mantener registros de que todo el personal conoce los manuales existentes en el laboratorio.
- Revisar al menos anualmente cada procedimiento y documentarlas actualizaciones.
- Todo ensayo realizado, independiente del método utilizado, debe incluir controles para verificación de la validez de la prueba.

El manual de procedimientos debe incluir las condiciones óptimas para la realización del ensayo en:

6.1 TOMA Y RECEPCIÓN DE MUESTRAS:

El laboratorio debe:

- Disponer de un manual de procedimientos para la toma, recepción de muestras, transporte, conservación y remisión de muestras (Resolución 1441 de 2013).

- Disponer de estrategias para la verificación de las muestras (nombre del paciente o donante, nombre y dirección de quien autorizó y ordenó la prueba, fecha de recolección de la muestra, origen de la muestra).
- Disponer de un sistema para la identificación y registro de las muestras garantizando la trazabilidad de la información desde la toma de la muestra hasta la interpretación y reporte de resultados.
- Asegurar las condiciones técnicas y ambientales mínimas.
- Definir criterios de aceptación y rechazo de las muestras.

Durante la atención de los pacientes y /o donantes vivos se debe:

- Realizar una entrevista con el fin de recolectar la siguiente información, necesaria para el ingreso de los datos del paciente y/o donante vivo al Sistema de Información que maneje el laboratorio:
 - Datos personales: nombre y apellidos completos, edad, sexo, identificación (cédula de ciudadanía, tarjeta de identidad, registro civil, cédula de extranjería,), fecha de la obtención/ recepción de la (s) muestra (s), dirección y número telefónico del paciente, nombre y apellidos del médico que solicita el examen, institución, número telefónico de quien solicita los exámenes, entidad aseguradora, nombre de los exámenes solicitados.
 - Datos clínicos: Enfermedad original, tipo de diálisis (en caso de trasplante renal), número de transfusiones sanguíneas, número de trasplantes y embarazos previos.
- Proporcionar información sobre el proceso pre trasplante documentación necesaria, envío de muestras, ingreso en el programa, horario de atención e información adicional pertinente). Toda la información dada se le puede entregar en forma escrita al paciente mediante circulares informativas.
- Obtener las muestras de sangre dependiendo del tipo de trasplante, y tipo de usuario (receptor o donante)

6.2 PROCESAMIENTO DE MUESTRAS:

Se debe realizar de acuerdo al tipo de muestra, paciente, donante, trasplante y el método seleccionado, siempre teniendo en cuenta las normas de bioseguridad.

6.3 REALIZACIÓN DEL ENSAYO

Para la realización del ensayo se deben seguir las consideraciones nombradas a continuación, adicionalmente, en el Anexo 2 se encuentran características específicas de cada tipo de ensayo seleccionado:

Todos los laboratorios deben documentar todo el proceso tomado para la utilización de un método de trabajo:

1. Seleccionar métodos con criterios técnicos y de pertinencia, basados en evidencia científica.
2. Estandarizar los métodos antes de su puesta en servicio.
3. Realizar las validaciones de métodos propios o modificaciones de métodos definidos internacionalmente y la confirmación de métodos validados internacionalmente.
4. El procedimiento final se debe documentar.
5. Los documentos se deben socializar con el personal del laboratorio.
6. Deben mantenerse copias en los lugares de uso que sean requeridos.
7. Cada procedimiento de ensayo debe incluir sus respectivos controles de calidad.
8. Se debe realizar revisiones periódicas para garantizar que el método mantiene las características en los siguientes casos:
 - Cambio de equipos críticos.
 - Cambios en infraestructura.
 - Cambios en personal experto.
9. Realizar un análisis y estimación de la incertidumbre de las pruebas realizadas (Identificar fuentes de incertidumbre y, si las tiene o no controladas).

El laboratorio debe contar con un listado de los ensayos realizados, el método utilizado para su realización, el nombre de la referencia bibliográfica donde está descrito el método se basa el método y el grado de resolución de la prueba realizada en caso que aplique.

Los procedimientos de ensayo deben incluir:

- El fundamento del método
- Un listado de equipos, reactivos y suministros requeridos
- Consideraciones generales que sean necesarias
- El paso a paso de método
- La bibliografía que aplique.

6.4 INFORME O REPORTE DE RESULTADOS:

- El informe o reporte de resultados debe contener lo siguiente:
 - Título claro y específico del tipo de prueba.
 - Nombre, dirección y teléfono del laboratorio.
 - Identificación única del reporte de resultados.
 - Nombre, dirección y relación del cliente (paciente, institución).
 - Fecha de recolección de la muestra
 - Fecha de realización del estudio
 - Fecha del reporte
 - Método utilizado.
 - Muestra utilizada para la realización de la prueba (sangre, ganglios linfáticos, bazo, medula ósea).
 - Resultado de la prueba.
 - Interpretación apropiada de la prueba cuando lo requiera.
 - Firma del analista, Coordinador o Director Técnico del laboratorio.
- Cada trabajo realizado en el laboratorio, debe quedar registrado en un informe que presente de forma exacta, clara y precisa, los datos de los pacientes y los resultados de las pruebas o exámenes realizados y cualquier otra información de utilidad. Todos los registros y documentación del laboratorio, deben mantenerse en archivo activo durante un (5) años y en

21

archivo muerto, el cual puede ser en medio electrónico durante (20) años después del último estudio realizado al usuario.

6.5 REGISTROS INTERNOS DE TRABAJO

- Todos los registros deben ser legibles, recuperables de fácil acceso y protegidos de manera que se evite su deterioro, modificación indebida o pérdida.
- Se deben mantener registros internos de las pruebas realizadas (cuadernos, hojas de trabajos, e informes de resultados). En caso de mantener los registros en medio magnético, se debe asegurar la no modificación de estos (Resolución 1441 de 2013).
- Identificar en las hojas de trabajo el tipo de muestra, identificación de la muestra, método utilizado, reactivo y equipo utilizado, fecha de realización y responsable de la prueba (EFI numeral C11).
- Conservar los registros de clasificación molecular por la técnica utilizada (fotografías de gel, membrana, autoradiografía, archivo electrónico, salida de lectura de un secuenciador) (EFI numeral C11).
- Mantener respaldo de los registros guardados en computador para evitar pérdidas de los datos (ASHI numeral D.6.3.3.3).
- El laboratorio debe tener un sistema adecuado para garantizar reportes de resultados oportunos, exactos, y confiables (EFI numeral C11).
- Los análisis por computador deben ser revisados, verificados y firmados por el Director Técnico o Coordinador del laboratorio antes de su emisión.
- Validar los programas de software utilizados para los análisis de los resultados (ASHI numeral D.4.1.4.1, EFI numeral C2.2).

6.6 ASEGURAMIENTO DE LA CALIDAD DE LOS RESULTADOS

El Laboratorio debe contar con un programa de aseguramiento de la calidad interno el cual puede incluir (NTC ISO IEC 17025):

- El uso regular de materiales de referencia certificados o un control de la calidad interno utilizando materiales de referencia secundarios;
- La participación en comparaciones interlaboratorios o programas de ensayos de aptitud;
- La repetición de ensayos utilizando el mismo método o métodos diferentes;
- La repetición del ensayo de los objetos retenidos;
- La correlación de los resultados para diferentes características de un ítem.
- Realizar un análisis de los reportes de control de calidad y toma de medidas correctivas documentadas.
- Conservar por lo menos durante un año los registros del aseguramiento de la calidad.

7. EVALUACION DE SERVICIO AL CLIENTE (pacientes, médicos tratantes, aseguradoras, IPS trasplantadoras) (EFI Numeral C9, ASHI D.2.4).

El laboratorio debe:

- Establecer un procedimiento para la reclamación de los clientes.
- Documentar los problemas que resultan de interrupciones en la comunicación entre el laboratorio y los individuos autorizados quienes ordenan las pruebas o reciben los resultados (ASHI, numeral D.2.5.2).
- Registrar las todas quejas y problemas.
- Investigar las causas del problema y tomar acciones correctivas cuando se amerite.

8. AUDITORÍA

Se deben generar actividades para verificar el cumplimiento de los presentes estándares, para lo cual se puede elegir entre las siguientes opciones:

Realizar auditorías internas para verificar el cumplimiento de toda esta normatividad, las cuales deben ser realizadas por personas con formación de auditores con base en una programación escrita. Se deben mantener registros de las auditorías realizadas y de las acciones correctivas, preventivas o de mejora que surjan.

Realizar Revisiones completas por la Dirección

Realizar el PAMEC (Programa de Auditoria para el Mejoramiento Continuo de la Calidad de la Atención en Salud) Resolución 1441 de 2013.

9. REFERENCIAS

1. Standards for Accredited Laboratories. American Society for Histocompatibility and Immunogenetics. 2012 Revised Standards Approved by the ASHI Board of Directors Approved by CMS - January 2012
2. Standards for histocompatibility testing Version 6.1. European Federation for Immunogenetics. Accepted by the Standards and Quality Assurance Committee on 10th October 2013. Accepted by the EFI Executive Committee on 5th June 2013. Effective from 1st October 2013.
3. Decreto 1011 de 2006. Ministerio de Salud y Protección Social.
4. Resolución 1441 de 2013 del Ministerio de Salud y Protección Social.
5. Norma NTC ISO IEC 17025

ANEXO 1

1 Perfiles mínimos que debe cumplir el personal del laboratorio:

1.1 Director Técnico Científico del Laboratorio:

- Profesional de Laboratorio clínico, ciencias biológicas o médico con maestría o doctorado en ciencias (inmunología o genética), o médico con posgrado en Patología Clínica, o tener una calificación equivalente aprobada por comités internacionales reguladores de trasplantes (EFI ó ASHI).
- Tener 3 años de experiencia en inmunología, de los cuales 2 años en pruebas de inmunología de trasplantes, reflejados por mediciones externas (Participación en talleres nacionales o internacionales y/o publicaciones en revistas indexadas).
- Tener competencias profesionales en las actividades que está involucrado el laboratorio.
- Tener disponibilidad permanente en o fuera del sitio de trabajo para proveer supervisión adecuada al personal.
- Tener habilidades científicas para desarrollar nuevos procedimientos.
- Tener la responsabilidad del funcionamiento del laboratorio (interpretación y reporte de todos los procedimientos).
- Debe estar informado de la legislación nacional relevante.

1.2 Analistas:

- Profesional en Laboratorio Clínico (Bacteriólogo, Microbiólogo)
- Otros profesionales en ciencias básicas, con entrenamiento certificado, podrán realizar las pruebas, pero por reglamentación nacional, no están autorizados para la toma de la muestra, ni para firmar resultados.

- Demostrar entrenamiento y calificación en la realización de pruebas inmunológicas para trasplantes.

2 Auxiliar de Laboratorio (Opcional)

Técnico del laboratorio preferiblemente con entrenamiento o formación en métodos inmunológicos o moleculares.

ANEXO 2

CONDICIONES ESPECÍFICAS DEPENDIENTES DEL MÉTODO SELECCIONADO

2.1 Clasificación Sanguínea ABO/RH (ASHI numeral D.5.2.12)

2.1.1 Aspectos generales

Se deben utilizar métodos de clasificación sanguínea validados internacionalmente.

2.1.2 Aspectos técnicos

- Si se usan métodos serológicos:
 - Utilizar reactivos de sueros de clasificación (anti-A, anti-B y anti-D)
- Determinar el grupo ABO sobre eritrocitos usando suero anti-A y suero anti-B y evaluar el suero o plasma para anticuerpos esperados con células A1 y B. Las células de cordón y sangre de recién nacidos deben ser evaluados solo para antígenos sobre eritrocitos no para anticuerpos.
- Si se va a determinar el subgrupo A1 del grupo ABO, utilizar un reactivo y una técnica documentada para no aglutinar las células A2 positivas.
- Determinar la clasificación Rh mediante sueros anti-D. Utilizar un sistema de control que sea apropiado para el reactivo anti-D que esté en uso.
- Documentar el desempeño del reactivo con controles celulares apropiados, cuando se realice control de calidad de los reactivos en uso o los de un nuevo lote
- Comparar la actual clasificación ABO/Rh con registros previos ya disponibles. Cualquier discrepancia entre el resultado actual y registros previos debe ser resuelta antes del trasplante.

2.2 Clasificación HLA clase I y clase II:

2.2.1 Aspectos generales

Se debe realizar obligatoriamente la clasificación para HLA-A, B, DRB1 a donantes y receptores de Trasplantes de órganos sólidos exceptuando los trasplantes de hígado; en caso tal cada programa de trasplantes definirá si la requiere. En el caso de trasplantes de órganos sólidos es opcional la clasificación para los loci HLA-C, HLA-DP y HLA-DQ. Es aceptable realizar clasificación de baja resolución (2 dígitos) para HLA-A, B, DRB1 en donantes y receptores de riñón, hígado, corazón, páncreas, tráquea e intestino.

En trasplante de células hematopoyéticas con donante vivo relacionado, se acepta la clasificación de baja resolución (2 dígitos) para HLA-A, B, DRB1 siempre y cuando el genotipo familiar haya sido determinado sin ambigüedades o clasificar HLA-A, B, DRB1 por alta resolución (4 dígitos) a receptores y donantes no relacionados.

Para mayor información sobre el tipo de pruebas y nivel de resolución empleado en trasplante de células hematopoyéticas consultar en el documento “Estudio inmunológico para trasplantes de células hematopoyéticas con donante vivo relacionado y con donante no relacionado (bancos de cordón umbilical o médula ósea)” emitido por el INS.

- La terminología de los alelos HLA y antígenos debe estar de acuerdo al último reporte del Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud (OMS) (ASHI numeral D.5.2.6.4, EFI D1).
- Los antígenos y/o alelos nuevos potenciales aún no aprobados por este comité deberían tener una designación local la cual no pueda ser confundida con la terminología de la OMS (EFI numeral D1, ASHI numeral D.5.2.6.4).
- Los fenotipos y genotipos deben ser expresados según lo recomendado por el comité de la OMS, así como se muestra en los siguientes ejemplos (EFI capítulo D):
 - Alelos solos: HLA-B*07. Antígenos solos: HLA-B7 (o B7 si es obvio en el contexto).

- Clasificación HLA: Asignación serológica: HLA-A2, 30; B7, 44; Cw5, Cw16; DR1, 4; DQ5, 7. Asignación molecular: HLA-A*02,*30; B*07,*44; C*05,*16; DRB1*01,*04; DQB1*05,*03:01.
- Genotipos. Asignación serológica: HLA-A2, B44, Cw5, DR1, DQ5/ A30, B7, Cw16, DR4, DQ7. Asignación molecular: HLA-A*02, B*44, C*05, DRB1*01, DQB1*05 / A*30, B*07, C*16, DRB1*04, DQB1*03:01.
- Se debe reportar las subdivisiones de los antígenos HLA B14 como B*64 o B*65, HLA B40 como B*60 o B*61 se exceptúa el HLA B*4005 el cual se debe reportar como B*40. Para el HLA B15 se reportaran las subdivisiones que permita discriminar el kit utilizado, sin embargo, aquellos que presenten ambigüedades se reportaran solamente como B15. De igual forma reportar las subdivisiones de los antígenos HLA DRB1-5 como DRB*11 o DRB*12, HLA DRB1-6 como DRB*13 o DRB*14, HLA DRB1-2 como DRB*15 o DRB*16 y HLA DRB1-3 como DRB*17 o DRB*18.
- Si solo se encuentra un antígeno o alelo en un locus ya sea por clasificación serológica o molecular, el fenotipo puede incluir a éste dos veces, solo si la homocigosidad es determinada por estudios de familia o si la clasificación demuestra inequívocamente la presencia de dos diferentes alelos de la misma especificidad. Por el contrario, un alelo o antígeno blanco puede ser solo asignado si se comprueba por estudios de familia.
- Si la clasificación inequívocamente demuestra la presencia de heterocigosidad para dos alelos diferentes de la misma especificidad (ej: DRB1*13:01/59, DRB1*13:03/33), el reporte podría incluir éste dos veces (DRB1*13,*13) incluso en ausencia de estudios familiares.
- La clasificación de alta resolución está definida como: a) Identificación de alelos HLA en un nivel de resolución el cual define el primero y segundo campo de acuerdo a la nomenclatura de la OMS, al menos resolviendo todas las ambigüedades que resultan de polimorfismos localizados al interior de los exones 2 y 3 para los loci HLA clase I, y en el exón 2 para los loci HLA clase II, y b) todas las ambigüedades que abarcan un alelo nulo, donde sea que esté localizado el polimorfismo, al menos que se pueda demostrar que sobre las células está presente un antígeno.

2.2.2 Aspectos Técnicos

2.2.2.1 Clasificación HLA por cebadores específicos de secuencia (PCR-SSP) (EFI numeral L9, ASHI numeral D.5.2.4)

- Cada reacción de amplificación debe incluir controles para detectar fallas técnicas (ej. un control interno tales como: cebadores adicionales o moldes que generen un producto que se pueda distinguir del amplificado específico).
- Asegurarse de que los cebadores usados producen cantidades adecuadas de productos de amplificación para ser visualizados.
- Cuando se evidencian amplificaciones no específicas y ausencia de amplificación del control interno, el laboratorio debe tener por escrito criterios de aceptación o rechazo de la prueba.
- En cada ensayo se debe incluir un control negativo o de contaminación (Pozo sin ácido nucléico).
- El laboratorio debe utilizar datos derivados del proceso de validación y de clasificaciones previas con el mismo lote de cebadores en la fase de interpretación de la clasificación. Las amplificaciones débiles o inespecíficas así como la tendencia a la formación de dímeros -cebadores deben ser definidas y documentadas.
- Todos los datos deben estar registrados y almacenados.

2.2.2.2 Clasificación basada en Secuencia (SBT) (EFI numeral L10, ASHI numeral D.5.2.5)

- Los moldes de secuenciación deben tener suficiente pureza, especificidad, cantidad y calidad para ofrecer datos de secuencia interpretables.
- Si se utiliza la clonación en la preparación de moldes, se debe determinar la secuencia de al menos tres diferentes clones por cada alelo para obtener resultados precisos.

- La validación de los métodos para la preparación de moldes debe asegurar que la exactitud de la clasificación final no se altere (Ej. Mutaciones durante la clonación, amplificación preferencial).
- Los moldes no deben tener inhibidores o contaminantes que afecten la reacción de secuenciación. Se debe realizar la purificación de moldes después de la amplificación para eliminar la presencia de dNTP, Taq polimerasa y cebadores de amplificación.
- Se debe definir la especificidad del molde en combinación con la secuencia del cebador (Locus y Alelos).
- La cantidad y calidad de los moldes, cebadores y los reactivos de secuenciación deben ser suficientes para ofrecer datos de secuencia interpretables.
- Las condiciones de la reacción de secuenciación deben ser documentadas y adecuadas para obtener datos de secuenciación primarios confiables
- Los criterios de aceptación de datos primarios deben ser establecidos (Intensidad de picos, fluctuaciones basales, forma de los picos, asignación correcta para posiciones no-polimórficas).
- La razón señal/ruido debe ser suficiente para asegurar la asignación de nucleótidos confiables.
- Se debe establecer técnicamente y científicamente un método de sondeo que permita la interpretación, aceptación y/o rechazo de secuencias de regiones las cuales son difíciles de resolver. Las características específicas de secuencia establecidas deben ser documentadas y utilizadas en la interpretación de rutina de los datos.
- Los métodos deben asegurar que las secuencias generadas por cebadores de amplificación no sean consideradas en la asignación de alelos.

- Determinar las secuencias tanto de cadenas sentido y antisentido, si una secuencia sugiere un alelo nuevo o una combinación rara de alelos.
- Se deben establecer criterios para la asignación de alelos basados en la terminología HLA emitida por el Comité de Nomenclatura de la Organización Mundial de la Salud.
- Todos los datos deben estar registrados y almacenados.

2.2.2.3 PCR por ensayos de sondas de oligonucleótidos de secuencia específica (PCR-SSOP) (EFI numeral L11, ASHI numeral D.5.2.3)

- Debe definirse la especificidad de cada sonda y secuencia blanco.
- Las sondas deben ser marcadas por un método adecuado al procedimiento evaluado.
- Las sondas deben ser almacenadas bajo condiciones que mantengan su especificidad y sensibilidad.
- Los laboratorios deben tener un procedimiento documentado para el control de calidad de cada lote de sondas. Para estuches hechos en casa, cada lote debe ser evaluado con un ADN de referencia para que al menos una vez cada sonda sea evaluada para especificidad y señal de intensidad. Para estuches comerciales cada lote debe ser evaluado en paralelo con un ADN de una muestra con clasificación conocida. Se debe establecer y monitorear la especificidad y señal de intensidad para cada sonda
- Se debe asegurar que la pre-hibridización, hibridización y detección sean llevadas a cabo bajo condiciones de concentración y astringencia determinadas empíricamente (de acuerdo a la longitud y composición de la sonda) que logren la especificidad definida. Para estuches comerciales, cualquier desviación de las especificaciones del fabricante debe ser validada y documentada.
- La amplificación debe ser monitoreada por electroforesis en geles antes de la hibridización (EFI, Numeral L11)

- Cada ensayo debe incluir una sonda interna para una región conservada del fragmento amplificado
- Cada ensayo debe incluir un control apropiado para validar la hibridización y el revelado.
- Se recomienda que un ADN de clasificación conocida se corra como control positivo en cada ensayo.
- Los límites aceptables de intensidad de señal deben ser especificados para resultados negativos y positivos. Se debe documentar y justificar si una prueba es aceptada con señales de sonda por fuera de los límites.
- Se debe asegurar que cada sonda usada da una adecuada señal y permite la detección de alelos en un individuo heterocigótico
- El laboratorio debe utilizar datos derivados del proceso de validación y de clasificaciones previas con el mismo lote de cebadores y sondas en la fase de interpretación de la clasificación. Las amplificaciones débiles o inespecíficas deben ser definidas y documentadas.
- Todos los datos deben estar registrados y almacenados.

2.3 Determinación de auto y aloanticuerpos

2.3.1 Determinación de auto y aloanticuerpos por citotoxicidad dependiente de complemento (NIH o AMOS o anti globulina humana).

2.3.1.1 Aspectos generales

- Utilizar técnicas validadas internacionalmente.
- Utilizar técnicas que discriminen aloanticuerpos contra Linfocitos T y Linfocitos B.
- Demostrar que el procedimiento de separación es eficiente para linfocitos T y B.

2.3.1.2 Aspectos técnicos

- El suero debe ser chequeado a una concentración que sea óptima para la detección de aloanticuerpos. En caso de realizar dilución (es) se debe documentar (EFI numeral F1, ASHI numeral D.5.2.7.1). Para pruebas cruzadas, la EFI recomienda usar suero no diluido y por duplicado.
- Realizar la prueba cruzada con sueros tratados con dithiotreitol (DTT) para determinar anticuerpos de tipo IgG.
- Cada prueba debe incluir suero control negativo (mezcla de sueros de hombres no inmunizados) para observar la viabilidad de las células del donante y un suero control positivo (Mezcla de sueros de individuos altamente sensibilizados) para evidenciar la actividad del complemento (EFI numeral F1).
- Realizar la determinación de autoanticuerpos a cada paciente utilizando suero tratado con DTT.
- Cada lote de complemento debe ser evaluado para determinar si éste media citotoxicidad en la presencia de anticuerpos HLA específicos y no es citotóxico en la ausencia de estos anticuerpos (EFI numeral E6).
- Registrar el porcentaje de células muertas en la prueba de citotoxicidad dependiente de complemento con la escala internacionalmente aceptada (0, 1, 2, 4, 6,8).
- Los sueros deben mantenerse congelados (EFI numeral F1).
- Los laboratorios deben mantener un registro de los eventos potenciales sensibilizadores para cada paciente (EFI numeral G3). Las muestras de suero deberían ser colectadas y almacenadas después de al menos dos semanas de haber ocurrido el evento para realizar las pruebas cruzadas.

2.3.2 Determinación de auto y aloanticuerpos por Citometría de Flujo (ASHI numeral D.5.2.9, EFI M).

2.3.2.1 Aspectos generales

Utilizar técnicas validadas internacionalmente

2.3.2.2 Aspectos técnicos

- Se debe utilizar un anticuerpo secundario F(ab)₂, marcado con fluorocromo, dirigido contra la región Fc de la cadena pesada de las inmunoglobulinas (IgG e IgM).
- Las subpoblaciones (CD3, CD19 y opcionalmente CD14) deberán ser identificadas con diferentes anticuerpos monoclonales, marcados con fluorocromos diferentes.
- Cada prueba debe incluir suero control negativo (mezcla de sueros de individuos no inmunizados) y un suero control positivo (suero humano específico para antígenos HLA y de un isotipo apropiado).
- El reactivo de anticuerpo secundario deberá ser titulado para determinar la dilución con actividad óptima (razón señal/ruido). Si se utiliza una técnica multicolor, el reactivo no debe demostrar reacción cruzada con los otros reactivos de inmunoglobulinas utilizados para marcar las células.
- Establecer el punto de corte para discriminar reacciones positivas independientemente del método usado para reportar los datos crudos (Cambios en los canales de mediana, media, o medidas de fluorescencia cuantitativa). Cualquier cambio significativo en el protocolo, reactivos o instrumentos requiere una nueva determinación punto de corte de positividad.
- Definir los períodos de tiempo aceptables entre el procesamiento, marcaje y adquisición de los datos. Las muestras control deben ser tratadas de la misma manera.
- Utilizar las diluciones y/o volumen de reactivos de acuerdo a lo validado localmente.

- Cada laboratorio debe establecer su propio protocolo de estudio de aloanticuerpos, estandarizar y optimizar los reactivos, tiempos de incubación y temperaturas.

2.4. Determinación de Anticuerpos Reactivos contra Panel (PRA)

2.4.1 Aspectos generales

Utilizar técnicas validadas internacionalmente

Los laboratorios pueden realizar la determinación de PRA cualitativo Clase I y Clase II, y PRA cuantitativo Clase I y Clase II de acuerdo a su infraestructura. Los laboratorios que no estén en capacidad de realizar algún tipo de prueba requerida para el trasplante pueden remitir las muestras a los laboratorios designados por el Instituto Nacional de Salud (INS) que ofrezcan dichas pruebas.

2.4.2 Aspectos técnicos

A continuación se describen algunos criterios para tener en cuenta de acuerdo a las técnicas empleadas:

En el caso de utilizar ensayos de fase sólida, el laboratorio debe (ASHI numeral D.5.2.8):

- Validar todos los cálculos. Determinar los puntos de corte negativos o positivos específicos para cada método.
- Establecer, verificar y seguir criterios para asegurar un suficiente número de perlas u otros sustratos de cada especificidad que son analizados en cada ensayo.
- Validar el método de ensayo usando anticuerpos humanos de referencia con especificidad(es) bien caracterizadas. El control de calidad subsecuente puede consistir de pruebas en paralelo con lotes previos.

2.4.2.1 Anticuerpos Reactivos contra Panel (PRA) determinados por Citotoxicidad dependiente de complemento o Citometría de flujo

2.4.2.1.1 Aspectos generales

Utilizar técnicas validadas internacionalmente

Para la realización del tamizaje de anticuerpos empleando citotoxicidad dependiente de complemento o citometría de flujo se deben seguir las consideraciones descritas anteriormente en la determinación de auto y aloanticuerpos.

2.4.2.1.2 Aspectos técnicos

- Si se utiliza una mezcla de células de varios individuos para determinar la presencia o no de anticuerpos, las células usadas deberían cubrir las especificidades mayores de antígenos. El laboratorio debe documentar los criterios para definir las especificidades mayores y el número de individuos incluidos en el panel.
- Panel de células: Las células blanco pueden ser mononucleares de sangre periférica, nódulos linfáticos, bazo, o líneas celulares; Para determinar anticuerpos específicos Clase II (Linfocitos B, líneas linfoblastoides de células B, células de leucemia linfocítica crónica).
- El panel de antígenos HLA debería incluir suficientes donantes para el panel de células para garantizar que sean adecuados para la población y el uso de los datos (EFI numeral F4).

2.4.2.2 Anticuerpos Reactivos contra Panel (PRA) determinados por Elisa (EFI).

2.4.2.2.1 Aspectos generales

Utilizar técnicas validadas internacionalmente

Si se utilizan estuches comerciales, debe seguirse estrictamente las instrucciones del fabricante a menos que el laboratorio haya realizado y documentado ensayos para soportar cualquier desviación en la técnica o en el análisis.

2.4.2.2.2 Aspectos técnicos

- Cada prueba debe incluir suero control negativo (suero de individuos no aloinmunizados) y un suero control positivo (suero humano específico para

antígenos HLA y del isotipo adecuado) y controles del reactivo. También se debe incluir en el ensayo un control de reacción el cual carece de antígenos HLA.

- Se deben documentar las diluciones realizadas a los reactivos y a las muestras.
- Los sueros debe ser evaluados a la concentración óptima para la detección de anticuerpos contra antígenos HLA. Se pueden utilizar con y sin dilución; se debe documentar si se utiliza dilución.
- Durante el procedimiento se debe mantener la identificación de la muestra y la orientación adecuada del plato.
- Se deben registrar en cada ensayo el número del lote y los valores de densidades ópticas de los reactivos de referencia y controles. Para que el ensayo sea válido, estos valores deben estar dentro de los límites aceptables.
- Los lotes de reactivos deben ser validados empleando un lote conocido para comparar el desempeño del nuevo lote o utilizando muestras de reactividad conocida con el nuevo lote.
- Se debe demostrar que la fuente de luz y el filtro del plato lector produce la intensidad y longitud de onda requerida para el ensayo (ASHI numeral D.4.1.7.6.1).
- El lector de Elisa debe tener calibraciones programadas, con frecuencia de acuerdo a su utilización.
- En caso de utilizar lavadores de micro platos se debe chequear y documentar el desempeño durante cada mes de uso (ASHI numeral D.4.1.7.6.3).

2.4.2.3 Anticuerpos Reactivos contra Panel (PRA) determinados por LUMINEX

2.4.2.3.1 Aspectos generales y técnicos

Utilizar técnicas validadas internacionalmente.

- Cada vez que se realiza un ensayo se debe calibrar el equipo (perlas calibradoras).
- Cada vez que se realiza un ensayo se deben chequear los valores de Inmunofluorescencia de los controles que incluyen los estuches comerciales (suero control negativo, perla control negativo, perla control positivo) y verificar que estos son acordes a lo estipulado por el fabricante.
- Validar los puntos de cortes empleados por el laboratorio. Se recomienda utilizar 5-10 muestras de donantes hombres AB+, no trasfundidos, no trasplantados para obtener un promedio del valor del trasfondo.
- Validar los parámetros del equipo (óptica, fluidos, etc.) mensualmente.