

DIRECCIÓN GENERAL DE SERVICIOS GANADEROS

**PROCEDIMIENTO PARA LA HABILITACIÓN Y
FUNCIONAMIENTO DE LOS LABORATORIOS
PARA DIAGNÓSTICO DE BRUCELOSIS BOVINA**

DIVISION LABORATORIOS VETERINARIOS
"MIGUEL C. RUBINO" (DILAVE)

Julio 2014

	ELABORADO POR	REVISADO POR	APROBADO POR
CARGO	Jefe Dpto. de Bacteriología DILAVE	Director DILAVE	Director General Servicios Ganaderos
FIRMA	Nora Negrín	Álvaro Núñez	
FECHA	22/07/2014		

1. Tabla de Contenido:

2. Introducción: -----	2
3. Objetivos: -----	2
4. Responsables: -----	2
5. Alcance, frecuencia y ámbito de aplicación: -----	2
6. Referencias: -----	2
7. Definiciones: -----	2
8. Desarrollo: -----	3
9. Abreviaturas y Siglas -----	8
ANEXO I -----	11
ANEXO II -----	12
ANEXO III -----	13

2. Introducción:

La Ley N° 17.950 de diciembre de 2005, de Acreditación de Veterinarios de Libre ejercicio para realizar actividades de apoyo a la Autoridad Sanitaria Oficial, en relación a la Campaña de Lucha contra Brucelosis Bovina, requiere la sistematización de las tareas inherentes a laboratorios habilitados, para realizar las pruebas serológicas de apoyo a la vigilancia epidemiológica.

3. Objetivos:

El objetivo de este documento es describir los procedimientos a seguir para la habilitación, registro, funcionamiento y control de laboratorios para el diagnóstico de Brucelosis, en el marco del Programa de control avanzado y erradicación de la Brucelosis bovina.

4. Responsables:

-La División Laboratorios Veterinarios Miguel C. Rubino (DILAVE), por la habilitación, registro, funcionamiento y control de los laboratorios (artículo 154 de la ley N° 18.834 de 4 de noviembre de 2011).

-La Unidad de Epidemiología (UNEPI) de la División de Sanidad Animal: a) por la evaluación de la calidad de los datos ingresados al SISA, generados por la actividad de los laboratorios; b) por el análisis de la información correspondiente; y c) por la remisión de información a DILAVE en caso que existan retrasos u omisiones en el envío y registro de los datos, a los efectos de iniciar los procedimientos tendientes a la captura de la información y/o a la tramitación de sanciones si correspondiere.

-Los laboratorios, por el cumplimiento de la normativa vigente.

5. Alcance y ámbito de aplicación:

El presente procedimiento se aplica a todos los laboratorios aspirantes a obtener la habilitación o mantenimiento de la misma, en el Registro de laboratorios para realizar los análisis correspondientes para el diagnóstico de la Brucelosis Bovina.

6. Referencias:

Decreto N° 79/84 de 22 de febrero de 1984, modificativos y complementarios.

Decreto N° 100/008 del 18 de febrero de 2008.

Resolución DGSG/RG/N° 41/08 de 3 de junio de 2008.

Ley N° 17.950 de 27 de diciembre de 2005.

Ley N° 18.362 de 6 de octubre de 2008, artículo 215.

Ley N° 18.834 de 4 de noviembre de 2011, artículo 154

Decreto N° 441/012 de 26 de diciembre de 2012

Decreto 500/991 de 27 de setiembre de 1991, modificativos y complementarios

7. Definiciones:

7.1 Laboratorio habilitado: Todo laboratorio público, privado o paraestatal, que haya obtenido la habilitación de la Dirección General de Servicios Ganaderos (DGSG) para el diagnóstico de Brucelosis bovina.

7.2 Laboratorio oficial: la División Laboratorios Veterinarios Miguel C. Rubino (DI.LA.VE.) de la DGSG, comprendiendo el laboratorio central en Montevideo y los Sub centros regionales de Tacuarembó, Treinta y Tres y Paysandú.

8. Desarrollo

8.1 Solicitud de habilitación:

8.1.1. Para la apertura de expediente de habilitación, la documentación deberá ser presentada en el DILAVE (Laboratorio Central o Sub centros del interior del país) en hoja A4, escrita a máquina ó computadora. No se recibirá documentación escrita a mano (con excepción del formulario de presentación) ni hojas cortadas (Decreto 500/991). El formulario de presentación podrá ser solicitado a la Unidad de Habilidadación de Laboratorios de DILAVE o descargarse de la página web del Ministerio de Ganadería, Agricultura y Pesca (<http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Default.htm>)

8.1.2. El formulario de presentación deberá ser completado en todos sus puntos.

8.1.3. Deberá adjuntarse a dicho formulario:

-Original y fotocopia del plano del laboratorio con las dimensiones y ubicación geográfica del mismo. Deben incluirse mesadas de trabajo con sus medidas y todos los equipos. (el funcionario receptor cotejará la fotocopia con el original y autenticará la fotocopia para ser incluida en el expediente, devolviendo el original al interesado).

- Copia de la resolución expedida por la DGSG de Acreditación del veterinario de libre ejercicio responsable (VLEA) en el Área de laboratorio para diagnóstico de Brucelosis bovina.
- Listado de equipamiento e instrumental, indicando: tipo de instrumento, cantidad, marca y modelo y capacidades.
- Modelo de planilla de emisión de resultados de acuerdo a la reglamentación vigente con la información identificatoria del laboratorio solicitante de la habilitación y sus datos. El modelo puede obtenerse en <http://www.mgap.gub.uy/DGSG/Default.htm>
- Horario de funcionamiento del laboratorio.
- Si el laboratorio es parte de una organización que realiza otras actividades diferentes a las del diagnóstico de laboratorio, tales como comercios veterinarios, cooperativas de productores o consignatarios de ganado, las responsabilidades del personal clave en la organización deben estar definidas, a fin de identificar potenciales conflictos de intereses. Debe existir un procedimiento escrito en el que conste cómo se identifican y se corrigen los conflictos de intereses, demostrando que se es imparcial y que su personal está libre de presiones comerciales, financieras y otras que pudieran afectar la calidad de su trabajo (artículo 6º de la Ley N° 17.950)
- Comprobante de pago de la tarifa fijada para la actividad de habilitación

8.2 Condiciones locativas y de equipamiento

8.2.1. El Laboratorio no debe tener comunicación directa con dependencias de vivienda.

8.2.2. El Laboratorio debe tener protección anti-insectos en puertas y ventanas.

8.2.3. El laboratorio debe tener al menos dos (2) áreas delimitadas:

a) Sala de recepción de muestras/escritorio.

b) Área de laboratorio

8.2.4. El área de laboratorio debe poseer pisos, paredes y mesas impermeables o impermeabilizadas, de manera tal que aseguren su perfecta higienización y desinfección. Deben presentar un buen estado de conservación (ausencia de grietas, rajaduras, pintura descascarada, goteras, etc.).

8.2.5. El área de laboratorio debe ser independiente de lugares en contacto con personas ajenas al mismo, animales o alimentos, restringiéndose el ingreso al mismo de personal no incluido en el plantel del laboratorio.

8.2.6. La zona de lavado debe contar con pileta para permitir la fácil limpieza del material y con recipientes apropiados para la recolección temporaria de residuos biológicos dentro del laboratorio, debidamente identificados. Estos residuos, así como las muestras procesadas que no se tengan que conservar, se deben eliminar de manera segura para evitar contaminación y contagio.

8.2.7. El área de laboratorio debe tener mesadas de trabajo apropiadas con buena iluminación sobre las mismas.

8.2.8. El laboratorio debe contar con un instructivo de higienización apropiado (mesadas, instrumental, etc.).

8.2.9. El laboratorio debe disponer del siguiente equipamiento como mínimo:

- a) heladera con freezer,
- b) un agitador con reloj para rosa de bengala
- c) pipetas graduadas a 0.03 ml (sueros) automáticas.
- d) pipetas graduadas automáticas o dispensador para 0.03 ml de antígeno,
- e) una centrifuga clínica con cabezal para tubos de ensayo con velocidad aproximada de 1500 RPM.
- f) una placa blanca de acrílico o material idóneo que permita la lectura.
- g) Una computadora con acceso a Internet.
- h) Equipamiento para mantener la temperatura ambiente entre 18 - 26°C
- i) Termómetro para control diario de temperatura de la heladera.
- j) Termómetro para control diario de temperatura ambiente.

Las pipetas graduadas y dispensadores deben calibrarse una vez al año, por parte de alguno de los organismos acreditados existentes.

8.3 Requisitos de documentación a llevar por el laboratorio

8.3.1. Un manual de procedimientos del laboratorio.

8.3.2. Registros. Debe contar con un libro numerado de registro de ingreso de sueros que contenga la siguiente información:

- a) N° de entrada interno,
- b) Fecha de ingreso de muestras
- c) Procedencia de las mismas (nombre del productor, departamento, paraje, número de DI.CO.SE. y nombre / número de registro del veterinario que la remite; cantidad de sueros que remite y sus respectivos resultados, tanto positivos como negativos),

- d) Motivo del examen (ferias, exposiciones, ventas, etc.)
- e) Número de planilla registrada con las identificaciones de los animales (trazabilidad) y resultados individuales.
- f) Registro de entrada del antígeno, donde conste fecha de adquisición, proveedor, serie, volumen, N° de frascos, fecha de vencimiento y fecha en que comenzó a usarse.
- h) Registro de entrada del antígeno al **SINAVELE**.
- i) Registro diario de la temperatura de la heladera.
- j) Registro diario de temperatura ambiente del laboratorio

8.3.3. Los laboratorios aceptarán solamente aquellas muestras que vengán acompañadas por el formulario correspondiente e ingresadas en el SINAVELE por los VLEA, acreditados en Brucelosis Bovina – Área de Campo.

8.3.4. Control de documentos: el laboratorio debe controlar toda la documentación sobre procedimientos, normas regulatorias, equipos, instrumental, calibración, formularios, registros, actividad con proveedores y eliminación de residuos de laboratorio.

8.3.5. Toda la información sobre muestras recibidas, remitentes y resultados, deberá ser estrictamente confidencial y no deberá quedar al alcance de personas no autorizadas para manejarla.

El archivo de la documentación deberá ser conservada a menos por 1 año y estará a disposición de los funcionarios oficiales de la DGSG cuando lo requieran.

8.4 Procedimientos

8.4.1 Descripción de la Prueba de Rosa Bengala:

Es una técnica serológica, de aglutinación en placa, cualitativa, para la detección de anticuerpos IgG contra *Brucella abortus* como tamiz, aprobada y de referencia por la OIE (Organización Mundial de Sanidad Animal).

La aglutinación ocurre cuando el suero estudiado contiene anticuerpos contra *Brucella abortus* y es enfrentado contra el antígeno de Rosa Bengala, en partes iguales. El fenómeno de aglutinación puede ser observado luego de 4 minutos de incubación a temperatura ambiente y agitación unidireccional. La prueba se considera positiva frente a la presencia de grumos, de cualquier intensidad. El resultado es negativo cuando no se evidencia ninguna aglutinación, permaneciendo homogénea la mezcla.

8.4.1.1. Procedimiento estándar de operaciones:

- a) Sacar sueros y reactivos de la heladera al menos 40 minutos antes de la prueba.
- b) Centrifugar muestras durante 10 minutos a 1500 rpm.
- c) Colocar 30 µl de suero en placa.
- d) Colocar enfrentado al suero 30 µl de antígeno de Rosa Bengala
- e) Mezclar ambas gotas (suero y antígeno) con varilla de vidrio.
- f) Agitar durante 4 minutos.
- g) Leer resultado en forma visual

8.4.1.1.2 Limite de detección.

Se considera positivo al suero que produzca una aglutinación evidente (visual) cuando es enfrentado al antígeno de Rosa Bengala.

8.4.1.1.3 Interferentes de la prueba

- a) hemólisis de la muestra (no deben procesarse muestras bemozadas)
- b) condiciones de mantenimiento del antígeno (temperatura 2 a 8°C).
- c) temperatura ambiente fuera del rango de entre 18 y 26°C.
- d) temperatura de los reactivos y de la muestra en el momento de la prueba.
- e) tiempo de incubación y agitación.

8.4.2. Muestras positivas

Los sueros positivos, acompañados del correspondiente formulario que provee la página web del SINAVELE, deben remitirse en forma inmediata a la DILAVE para su confirmación.

En forma paralela y simultánea al envío de las muestras al laboratorio oficial, debe ser enviada vía electrónica al SISA.

La omisión o retraso de las obligaciones establecidas precedentemente, podrá determinar la aplicación de las sanciones legalmente establecidas.

8.4.3 Medidas preventivas y procedimientos de verificación

Para asegurar la confiabilidad de los resultados, debe desarrollarse rigurosamente un control de calidad, que minimice los errores. Para ello deben implementarse todas las medidas necesarias que aseguren un resultado válido, desde la colecta de sangre por parte del profesional en el campo, hasta el informe del laboratorio, el envío de

muestras positivas para su confirmación y la actualización vertida al SISA en los plazos estipulados.

8.4.3.1 Como mínimo, en cada jornada de trabajo, así como con el ingreso de otra partida de antígeno, se deben procesar dos “sueros controles” (negativos y positivos), al inicio del procesamiento del lote y al final del mismo. Si alguno de los “sueros controles” no obtuvieran un resultado acorde, se deberá repetir la prueba con todos los sueros procesados en ese lote, debiendo registrarse el evento en el libro de novedades del laboratorio. La DILAVE podrá proveer “suero control” positivo cuando sea necesario.

8.4.3.2 Los laboratorios habilitados participarán en controles interlaboratorios, toda vez que la autoridad sanitaria lo estime pertinente.

8.4.3.3 Toda muestra de suero procesada por el laboratorio, debe ser conservada congelada hasta 30 días luego de ser ingresada al **SINAVELE**, de modo que la autoridad sanitaria pueda hacer nuevas pruebas, si así se requiriese.

8.4.3.4 Calidad de la muestra. Si existen deficiencias en la calidad de la muestra, como hemólisis, mala identificación de las mismas, mal acondicionamiento o cantidad insuficiente, etc, el laboratorio debe comunicar al veterinario responsable de la extracción de la sangre y practicarse las correspondientes acciones correctivas.

La responsabilidad del laboratorio comienza con la recepción de la muestra.

8.4.4 Equipos y reactivos.

Debe verificarse periódicamente el correcto funcionamiento de centrífugas, heladeras, freezer y micropipetas, así como todo equipo que sea necesario para la conservación y análisis de las muestras serológicas.

Debe existir un programa anual de calibración de las pipetas usadas en la técnica, por parte de un organismo acreditado.

El reactivo de Rosa de Bengala debe ser conservado a temperatura de 4°C, observándose la fecha de vencimiento.

8.4.5. Informes

Cada laboratorio remitirá y/o ingresará dentro de un plazo máximo de 5 días hábiles luego de realizada la extracción de sangre, todos los datos requeridos por el SISA. En

caso de rechazo de la información, por no cumplir con alguno de los requisitos, deberá ser reenviada, previa corrección, dentro de las 48 horas hábiles.

8.5 Registro de laboratorios

La UNEPI asignará un número clave a cada laboratorio e ingresará la misma al SISA, de modo de mantener “on line” un registro de laboratorios habilitados,

8.5.1 Acceso al registro: Los laboratorios de diagnóstico que deseen participar de la Campaña, deberán ser habilitados por la DGSG, a través de la Unidad de Habilitación de Laboratorios (UHL) de la DILAVE (DGSG – RG 29/02), debiendo cumplir los requisitos que se especifican en el presente documento.

8.5.2 Egreso del registro

Quedarán fuera del registro, los laboratorios que así lo soliciten.

Los laboratorios que no cumplan con los requisitos de habilitación establecidos en el presente procedimiento; los que no hayan registrado actividad durante 3 meses consecutivos o no hayan ingresado sus datos en el SINAVELE en los plazos establecidos, quedarán suspendidos del registro hasta su regularización.

La lista de los laboratorios habilitados y suspendidos, así como sus responsables técnicos, será publicada en la página Web del MGAP.

8.5.3 Reingreso al registro:

Podrán reingresar al registro de laboratorios habilitados, todos aquellos que demuestren estar en condiciones de hacerlo.

8.6. Control Oficial de los laboratorios habilitados.

Los Servicios Oficiales controlarán el funcionamiento de los laboratorios habilitados en todo momento que se estime necesario, por medio de inspecciones y auditorías, tanto en sus aspectos técnicos como en la información y los datos generados.

9. Abreviaturas y Siglas

DILAVE División de Laboratorios Veterinarios

DGSG Dirección General de Servicios Ganaderos

DSA División Sanidad Animal

UNEPI Unidad de Epidemiología.

LH Laboratorio Habilitado

SISA Sistema de Información en Salud Animal

SINAVELE Sistema Nacional de Veterinarios de Libre Ejercicio

OIE Organización Mundial de Sanidad Animal

UHL Unidad de Habilitación de Laboratorios de la DILAVE

VLEA Veterinario de libre ejercicio acreditado

ANEXO I

DIAGNOSTICO DE BRUCELOSIS

PROCEDIMIENTO A SEGUIR POR PARTE DE LABORATORIOS HABILITADOS PARA LA REMISIÓN DE LOS SUEROS A DILAVE (PRUEBAS COMPLEMENTARIAS)

A I 1. Los sueros deben ser remitidos sin coágulos y centrifugados.

Para la realización de las Pruebas de Rosa de Bengala y Rivanol no se pueden procesar sueros hemolisados ni turbios.

A I 2. Debe enviarse un mínimo de 1 ml de suero (para la prueba de Rivanol se necesitan 0,4ml de suero), conservándose una fracción del mismo, congelada en el laboratorio por el plazo de 30 días.

A I 3 Los sueros deben estar refrigerados o congelados.

A I 4 Las muestras deben tener una correcta identificación, con tinta indeleble, o con etiquetas bien pegadas y escritura legible.

A I 5 La muestra debe ser acompañada por el formulario que provee el SINAVELE, en todos los casos, en la cual constarán solo los sueros positivos a Rosa de Bengala.

A I 6 Los formularios deben estar protegidos de forma de preservar las condiciones de lectura correctas (que no se mojen ni se rompan).

Nota:

- Las condiciones de embalaje deben ser tales, que no impliquen riesgo para quien las manipula, evitándose la pérdida de líquidos (sueros, líquido refrigerante, etc.).
- Debe asegurarse una correcta cadena de frío. Las conservadoras se acondicionarán teniendo en cuenta las condiciones del traslado.

ANEXO II

INGRESO AL SINAVELE

Dentro de los 5 días hábiles de realizada la prueba de Rosa de Bengala se deben ingresar todos los datos correspondientes en el SINAVELE (<http://www.mgap.gub.uy/sinavele/hsinavele.aspx>).

Cuando no se realicen análisis de diagnóstico de Brucelosis durante un lapso 90 días (3 meses) debe comunicarlo al SISA (sisalaboratorios@mgap.gub.uy).

Consultas, dudas, comentarios: comunicarse con:

Unidad de Epidemiología del MGAP - Tel. 24104155 al 59 int. 405

ANEXO III

INSTRUCTIVO

Prueba de Rosa de Bengala. OIE 2008

- i) Mantener las muestras de suero y de antígeno a temperatura ambiente ($22 \pm 4^{\circ}\text{C}$); solo debe sacarse del refrigerador el antígeno necesario para las pruebas del día.
- ii) Colocar 25–30 μl de cada muestra de suero en una superficie blanca, placa esmaltada o de plástico, o en una placa para hemaglutinación de la OMS.
- iii) Agitar el frasco de antígeno suavemente, y colocar el mismo volumen de antígeno próximo a la gota de suero.
- iv) Inmediatamente después de añadir la última gota de antígeno en la placa, mezclar cuidadosamente el suero y el antígeno (usando una varilla de vidrio o plástico para cada prueba) hasta producir una zona circular u oval de aproximadamente 2 cm de diámetro.
- v) Agitar la mezcla suavemente durante 4 minutos a temperatura ambiente, en un agitador circular o tridimensional (si la zona de reacción es oval o circular, respectivamente).
- vi) Luego de 4 minutos, comprobar la aglutinación. Cualquier reacción visible se considera positiva. Antes de comenzar las pruebas de cada día, se debe comprobar que un suero control origine una reacción positiva mínima, con el fin de verificar la sensibilidad de las condiciones de la prueba.

La RBT es muy sensible. Sin embargo, como toda prueba serológica, a veces origina una reacción positiva debido a vacunación con S19 o a reacciones serológicas positivas falsas (FPSR). Por tanto, las reacciones positivas deben confirmarse con estrategias confirmativas (que incluyan tanto la realización de otras pruebas como la investigación epidemiológica). Las reacciones negativas falsas se producen muy raramente, sobre todo debido a los fenómenos de prozona y en ocasiones se pueden detectar diluyendo la muestra de suero o volviendo a probarla después de 4–6 semanas.