



INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE

**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD
EN EL LABORATORIO CLINICO**

**MINISTERIO DE SALUD
1998**

WH 25
759
1998



INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE

**MANUAL DE CONTROL DE CALIDAD
EN EL LABORATORIO CLINICO**



**MINISTERIO DE SALUD
1998**

2001

Donación (Rilac) (Wrs)

2357

EDITORES EN JEFE:

Dra. INGRID HEITMANN G. MD, FRCPC.
Jefa Sub. Dpto. Microbiología Clínica

T.M. AURORA MALDONADO B.
Laboratorio Neisserias

COMITE EDITORIAL:

Q.F. DARWINS CASTILLO
Jefe Sección Inmunodiagnóstico
Dra. INGRID HEITMANN
B.Q. AURORA FLORES
Sección Química Clínica
T.M. AURORA MALDONADO

AUTORES PRINCIPALES:

T.M. BERBELI ASTORGA
Jefa Sección Parasitología
Q.F. DARWINS CASTILLO
T.M. VALERIA CEPEDA
Jefa Sección Hematología
Dra. INGRID HEITMANN
B.Q. AURORA FLORES
T.M. ROSARIO LEPE
Jefa (S) Sección Micobacterias
T.M. AURORA MALDONADO
Dra. JUDITH MORA MV
Jefa Sección Virología
Q. F. LILIANA URRRA
Jefa Sección Serología de Sífilis

AGRADECIMIENTOS:

Al Dr. LUIS RODRIGUEZ A. M.V. M.Sc.
Por su colaboración a la comprensión del análisis estadístico.

Al Sr. ALEJANDRO ESCOBAR B.
Por la transcripción y procesamiento del texto.

ISBN 956-7770-00-X

© Instituto de Salud Pública de Chile
Permitida su reproducción total o parcial citando fuente y autores.

MINISTERIO DE SALUD
INSTITUTO DE SALUD PUBLICA DE CHILE
DEPARTAMENTO LABORATORIOS DE SALUD
Av. Marathon 1000, Ñuñoa, Santiago, Chile
Web internet: <http://www.ispch.cl>
E-mail: casilla@ispch.cl
Teléfonos: 239 11 05 - 237 00 96 - Faxes: 239 69 60 - 239 74 00
Santiago, Chile, 1998



Contenido	Pág.
<i>Prólogo del Dr. Gonzalo Navarrete Muñoz</i>	V
<i>Prefacio del Dr. Julio García Moreno</i>	VII
<i>Introducción</i>	IX
CAPÍTULO I Garantía de calidad en el laboratorio clínico	1.1
CAPÍTULO II Manual de procedimientos	2.1
CAPÍTULO III FASE PRE-ANALITICA: Toma de muestras	3.1
CAPÍTULO IV FASE PRE-ANALITICA: Mantenimiento y control de equipos y accesorios	4.1
CAPÍTULO V FASE ANALITICA: Parasitología	5.1
CAPÍTULO VI FASE ANALITICA: Inmunología	6.1
<i>Departamento Laboratorios de Salud</i>	III

CAPÍTULO VII FASE ANALÍTICA: Bacteriología	7.1
CAPÍTULO VIII FASE ANALÍTICA: Micobacterias	8.1
CAPÍTULO IX FASE ANALÍTICA: Virología	9.1
CAPÍTULO X FASE ANALÍTICA: Serología de sífilis	10.1
CAPÍTULO XI Procedimientos generales de control de calidad en el laboratorio clínico, con especial énfasis en química clínica y hematología	11.1
CAPÍTULO XII Programas de evaluación externa de calidad	12.1
CAPÍTULO XIII FASE POST-ANALÍTICA: Informes de resultado	13.1
CAPÍTULO XIV FASE POST-ANALÍTICA: Valores de referencia	14.1
CAPÍTULO XV Glosario	15.1

Prólogo

El aporte del laboratorio clínico representa cada vez más un elemento clave en el manejo clínico y epidemiológico de la salud de la población. Dado el avance de la medicina moderna, sin este apoyo sería difícil para un clínico llegar a un diagnóstico de la precisión que exige el arsenal terapéutico actual, y luego efectuar el seguimiento de sus indicaciones. Por otra parte, los sobre 30 millones de exámenes de laboratorio efectuados anualmente en el país, representan un porcentaje significativo de los recursos de salud invertidos en esta área específica y en consecuencia, exigen su adecuada administración asegurando la calidad del producto final.

Frente a esta realidad el laboratorio debe estar preparado para enfrentar su responsabilidad, asumiendo el desafío técnico y ético que significa entregar resultados confiables, reproducibles y oportunos para la toma de decisiones en salud.

El gran beneficiado con los programas de control de calidad es la población del país, que recibirá una mejor atención en salud, con diagnósticos más precisos que llevarán a tratamientos adecuados, disminución de días de hospitalización, menor tiempo de incapacidad familiar o laboral, disminuyendo aún el riesgo de enfermedad por el aporte epidemiológico que representa el análisis de buenos datos de laboratorio. Debe destacarse que dentro del equipo de salud, se beneficia en particular el propio laboratorio y su personal, al mejorar su imagen de eficiencia dentro del esfuerzo en salud y en su satisfacción por el trabajo desarrollado bajo su responsabilidad. Se ha demostrado que un programa total de control de calidad mejora las relaciones interpersonales, estimula el trabajo en equipo y aumenta el compromiso del personal con los valores superiores de salud pública.

El Instituto de Salud Pública, en su carácter de laboratorio nacional y de referencia, ha enfrentado la tarea de colaborar con los laboratorios del país en esta área. Es así como se

mantiene programas de trabajo que incluyen actividades de normalización, de evaluación externa de calidad (PEEC), de supervisión, capacitación y asesoría. En esta misma línea y bajo el concepto de una gestión de calidad dirigida a la satisfacción del usuario, es que ahora entregamos este Manual de Control de Calidad. Hacemos llegar así a todos los laboratorios los conceptos de la calidad y recomendaciones prácticas con las cuales puedan enfrentar el desafío de la implementación sistemática de un programa total de calidad.

Esta publicación representa el trabajo de numerosos profesionales de la Institución, que esperan de esta forma, contribuir a mejorar el nivel técnico de esta área específica del quehacer en la atención de salud de la población.

DR. L. GONZALO NAVARRETE MUÑOZ
Director
INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE

Prefacio

Existe conciencia universal acerca del aporte clave del laboratorio en la medicina moderna y de la necesidad que éstos adopten una gestión de calidad que les permita proporcionar un nivel óptimo de seguridad en sus exámenes.

Esta tarea no resulta fácil si consideramos que el laboratorio está experimentando un desarrollo acelerado, que incluye nuevas tecnologías, equipos cada vez más complejos, nuevos tipos de muestras con volúmenes reducidos, requisitos de confidencialidad, procedimientos menos invasivos, mayor rapidez de resultados, etc. Ello implica nuevos factores de error que es imprescindible controlar y la necesidad de mantener sistemas de alerta permanentes para detectar fuentes emergentes de variación de resultados.

El campo de acción del control de calidad se ha desarrollado enormemente en las últimas décadas, tanto en lo relativo a conceptos y técnicas como en su organización. Es así como surge un conjunto de principios y prácticas que se ha denominado "control total de la calidad". Este ha sido definido por Feigenbaum como el conjunto de esfuerzos de todos los integrantes del equipo para desarrollar mantener y superar la calidad de sus servicios, de forma de satisfacer plenamente las necesidades de sus usuarios al nivel más económico posible. De esta manera, este programa se transforma en un medio de participación de todos los trabajadores del laboratorio en una actividad integral de gestión de calidad dirigida al usuario.

Al comenzar un programa de control total de la calidad es recomendable efectuar un diagnóstico de situación inicial seguido de una implementación gradual a través de la priorización de las áreas más críticas según la realidad de cada servicio. Para tener éxito en la tarea debe lograrse crear "conciencia de responsabilidad en calidad" en todo el personal del laboratorio, de forma que los cambios en las prácticas y procedimientos sean

internalizados, aceptados y entendidos por todos los trabajadores. Complementando lo anterior, es necesario planificar estableciendo responsabilidades específicas para ordenar el proceso, facilitar el seguimiento y distribuir las tareas.

Cabe recordar que la calidad en el laboratorio, trasciende sus fronteras, ya que involucra necesariamente a todo el equipo de salud, pasando a ser cruciales los pasos pre y post analíticos que incluyen la decisión de un examen, la toma de muestra, el transporte y las comunicaciones que llevan el resultado al clínico solicitante.

Bajo este esquema, la implementación de un programa de calidad implica una visión y revisión integral del laboratorio incluyendo actividades tan diversas como: diagnóstico de situación, manuales de procedimientos, identificación de métodos para mejorar la calidad, establecer objetivos de calidad, aplicación de cambios para alcanzar metas, comprometer a los funcionarios, documentación del programa, coordinación de responsabilidades, comunicación, capacitación, etc.

En atención a la complejidad del tema, es que este Manual tiene el propósito de servir de guía en la solución de los problemas que enfrenta el laboratorio clínico para cumplir el objetivo de mejorar la calidad de sus prestaciones, estableciendo localmente programas continuos de calidad que incluyan todos los aspectos de la cadena que se inicia con la decisión médica de solicitar un examen y concluyen con la entrega oportuna de resultados confiables al solicitante.

DR. JULIO GARCÍA MORENO
JEFE DEPARTAMENTO
LABORATORIOS DE SALUD

Introducción

El laboratorio clínico se ha ido fortaleciendo en su capacidad tecnológica, con la disponibilidad de manuales de procedimientos y estandarización y, en el último tiempo, con la implementación de programas de Control de calidad.

El manejo de la calidad en el laboratorio clínico no sólo incluye los conceptos más tradicionales del control de calidad, como el mejoramiento y la evaluación externa de la calidad, que tienen como propósito mantener en cualquier proceso un rendimiento a un nivel aceptable o satisfactorio según estándares, sino también incluye el mejoramiento continuo de la calidad bajo el concepto de Calidad Total.

Bajo la filosofía de Calidad Total el control de calidad se refiere a elementos de fase pre-analítica, de fase analítica y post analítica. Incluye la preparación del paciente, obtención, manipulación e identificación de la muestra o espécimen, reactivos, equipos, patrones, métodos, valores de referencia, informes, resultados, evaluación externa y capacitación del personal.

La información que proporcionan las determinaciones del laboratorio es la base para la toma de decisiones clínicas en el manejo de los pacientes, sobre todo cuando ésta excede de los límites de criterios normales. Por lo tanto, la implementación de programas de calidad adecuados, validan los resultados producidos en el laboratorio clínico, en beneficio del paciente y del sistema global de salud.

Este manual ha sido desarrollado con el propósito de ser una guía de recomendación y de estímulo para una gran mayoría de laboratorios clínicos que están iniciando el desarrollo de programas de calidad, así como para aquellos con programas establecidos que les permita orientarse en áreas poco comunes o de mayor complejidad.

Capítulo I

**GARANTÍA DE CALIDAD EN EL
LABORATORIO CLÍNICO**

Aurora Flores Crocco



GARANTÍA DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLINICO

El Laboratorio Clínico tiene como función principal el proporcionar al equipo de salud resultados de exámenes respecto de los pacientes, para ser utilizados en la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades. Estos análisis deben reflejar indudablemente el estado de los pacientes en ese instante.

La Organización Internacional de Estandarización (I.S.O.) define la **calidad de un producto o servicio** como el conjunto de características del mismo relacionadas con la habilidad para satisfacer necesidades establecidas para ese producto o servicio.

Para asegurar la calidad de las prestaciones es necesario desarrollar un **Sistema de Garantía de Calidad** que consiste en implementar un programa completo que avale que el resultado final informado por el laboratorio, es **correcto y útil**. Este sistema abarca las políticas que orientan la planificación de acciones como:

—**Establecer una política de calidad:** el jefe del laboratorio debe establecer metas de calidad y evaluar su cumplimiento, indicando el compromiso de implementar y mantener un alto estándar de calidad en el laboratorio.

—**Procedimientos organizativos y administrativos:** éstos deben describir las funciones organizativas y administrativas de las distintas personas responsables y los procedimientos relevantes de cada área.

—**Procedimientos operativos estándares:** éstos deben describir los procedimientos de medición reales, estandarizados y detallados, tanto administrativos como técnicos, necesarios para ejecutar el trabajo del laboratorio.

POLÍTICA DE CALIDAD

El laboratorio debe tener como meta final el trabajo en base a **Calidad Total**, la cual se refiere al enfoque de la calidad dentro del laboratorio y de la organización en la que éste funciona. Incluye todas las actividades que determinan el conjunto de intenciones, dirección, objetivos y responsabilidades junto con los medios para su implementación. La **Evaluación de la Calidad** y la **Mejoría Continua de la Calidad** son las dos partes de este proceso.

1) EVALUACIÓN DE LA CALIDAD

La evaluación de la calidad se realiza a través del **Control de Calidad (CC)** definido como técnicas operativas y actividades necesarias para cumplir con los requisitos de calidad.

- a. El **Control de Calidad Interno** consiste en supervisar diariamente los procedimientos realizados en el laboratorio para cumplir con los requisitos de calidad del servicio: procedimientos efectuados para obtener especímenes (muestras) en forma adecuada, su transporte al laboratorio, el contar con métodos analíticos estandarizados, insumos de buena calidad, instrumentos calibrados, sistemas de detección y eliminación de errores que causan desempeño insatisfactorio, asegurar que sólo se informen resultados confiables, y mantener educación continua de todo el personal.

También es útil para lograr efectividad en el aspecto económico y en el tiempo de retorno del resultado al médico, pues se evita efectuar repeticiones de análisis innecesarios cuando todos los aspectos del quehacer del laboratorio están bajo control.

- b. **Evaluación Externa de la Calidad:** es un proceso de comparación de los resultados de mediciones informados por un laboratorio respecto de los resultados obtenidos por otros laboratorios que analizan el mismo material de control por medio del mismo u otro método analítico o valores de referencia. El material de control es distribuido por un organismo externo, el que analiza los datos estadísticamente en la mayoría de los casos y emite un informe a cada participante de modo que el laboratorio juzgue su desempeño individual.

Esta es la forma de medir la habilidad de los distintos laboratorios para obtener el mismo resultado al analizar idéntico material de control. Cabe destacar que para que estos programas sean de utilidad para medir la verdadera pericia del laboratorio, se requiere que los controles sean sometidos al mismo tratamiento que las muestras de pacientes. Por otro lado, son útiles para resaltar áreas de inexactitud analítica y para estimular que disminuya la variación de resultados interlaboratorio. Este es un medio para darle confianza a los usuarios de un laboratorio clínico.

2) MEJORÍA CONTÍNUA DE LA CALIDAD

El concepto de **Mejoría Continua de la Calidad (MCC)** se refiere tanto a una filosofía como a un sistema de administración. Considera además de los métodos tradicionales de control y garantía de calidad del laboratorio, una ampliación de actividades en la búsqueda de la calidad.

La **Mejoría Continua de la Calidad** son aquellas acciones necesarias para aumentar la efectividad y la eficiencia de **la estructura, el proceso y los resultados**.

Estructura del laboratorio clínico: instalaciones físicas, equipamiento y un patrón de organización de las responsabilidades, las autoridades y relaciones a través de las cuales el laboratorio lleva a cabo sus funciones.

Proceso: considera todos los pasos que involucra la toma, el transporte, la recepción y el análisis de la muestra y el informe de los resultados hasta llegar a las manos del médico tratante.

Resultado: es el producto o servicio proveniente de las actividades o procesos que se hayan realizado en el laboratorio. No sólo es la producción de resultados de alta calidad sino que también la adecuada interpretación y su aplicación a la prevención, diagnóstico y tratamiento de enfermedades.

La **meta** es proporcionar beneficios adicionales a la organización para otorgar un mejor servicio a los usuarios.

La Filosofía de Mejoría Continua de la Calidad (MCC) requiere de un compromiso colectivo del laboratorio en conjunto con la organización en la que está inmerso.

Está basada fundamentalmente en incorporar tres conceptos:

- a) Es más efectiva la modificación de los sistemas y procesos para cambiar nuestro comportamiento que el intento de modificar a las personas.
- b) La capacitación, el apoyo y la consulta conducen al progreso; se considera que es menos efectivo el poner reglas y hacer que se cumplan.

- c) Identificar y mejorar aquellos procesos que influyen significativamente sobre el resultado.

El enfoque de la MCC acepta que los errores son propios de la vida y que forman parte de nuestros sistemas y procesos. En lugar de buscar culpables, la MCC esta dirigida a comprender y modificar los sistemas y procesos mismos. La nueva meta es **educar, informar y apoyar** al personal incentivando la cooperación y participación. El objetivo es la excelencia y la mejoría continua, no el énfasis sobre la incompetencia; de este modo los usuarios y los proveedores del laboratorio se convierten en aliados.

El modelo de Mejoría Continua de la Calidad involucra y compromete a las más altas autoridades de la organización. En general es un proceso lento. Si no es posible introducir el concepto global de calidad total en la institución, se debe al menos mejorar el trabajo en el laboratorio. Requiere de algunos conceptos básicos, como:

Principio fundamental: El logro de un compromiso real por parte de todo el personal del laboratorio dará resultados más efectivos y más eficientes.

Primero:

Se debe tener conocimiento de las personas y especialidades a quienes sirve el laboratorio. Definir qué necesitan y esperan del laboratorio el equipo de salud y los pacientes.

Segundo:

Se requiere que el personal se concentre en lo que hace en el laboratorio para lograr que los procesos y resultados sean los deseados.

Tercero:

Es necesario instruir a todo el personal del laboratorio respecto de la importancia y beneficios que proporciona el trabajo en equipo.

Cuarto:

Proporcionar liderazgo para estimular, guiar y facilitar la labor.

Quinto:

Mejorar constantemente las actividades del laboratorio adoptando un esquema de mejoría continua que involucre a todo el personal.

PASOS BÁSICOS DEL MANEJO DE CALIDAD

¿Qué hacer?

1.- La estructura de organización del laboratorio

- a. Debe existir un organigrama o representación gráfica de la estructura formal de organización indicando: las líneas de autoridad, responsabilidad y coordinación entre el laboratorio, servicio clínico intra-hospitalario, institución, paciente. También deben incluirse las estructuras organizativas del sistema de garantía de calidad.
- b. Una declaración del propósito, las funciones, las metas específicas, los objetivos medibles y la implementación del plan.
- c. Disponer de mecanismos que permitan visualizar y revisar el propósito, las metas y los objetivos (Ej.: utilizar cartas Gant e indicadores de gestión).
- d. Establecer un grupo de administración gerencial del laboratorio con objetivos definidos y representatividad amplia del personal. Debe sesionar regularmente (Ej: una vez por semana) y llevar un registro resumido o acta de los puntos que se traten en la sesiones.
- e. Designar reuniones de trabajo de todo el personal del laboratorio (Ej.: sesionar una vez al mes), para hacer recomendaciones sobre el propósito, las metas y el plan operativo del laboratorio.
- f. Establecer acuerdos con los grupos de usuarios para optimizar el uso adecuado de los servicios del laboratorio (Ej.: el laboratorio clínico debe organizar seminarios y los profesionales deben participar en reuniones clínicas).

2.- Educación y entrenamiento

Es fundamental que el laboratorio clínico cuente con el personal necesario y calificado para desempeñar el trabajo asignado; debe asegurarse su adecuado entrenamiento antes de hacerlo responsable de tareas independientes, siendo esto la responsabilidad del profesional que conduce el laboratorio. Además, cada miembro del personal debe

familiarizarse y estar al día en los avances y cambios en la teoría y en la práctica del área en la cual se ha especializado, con el propósito de desarrollar y aplicar continuamente buenas prácticas de laboratorio.

Tanto los integrantes del personal como el jefe son responsables de planificar la capacitación continua a través de:

- Un programa de orientación para funcionarios nuevos o para aquellos que regresan de alguna ausencia.
- La definición de criterios de desempeño que proporcionen una base para evaluar la superación.
- Programas de educación en el servicio.
- Asistencia a cursos, talleres, seminarios, conferencias, congresos, y pasantías de entrenamiento a las personas responsables de acuerdo a funciones asignadas.

3.- Garantía de la calidad

Debe existir un programa planificado y sistemático de seguimiento y evaluación de los servicios que presta el laboratorio para identificar y resolver problemas. Este programa debe estar claramente documentado, ser aplicable, ser capaz de identificar problemas y deben quedar registradas las evaluaciones y las acciones efectuadas que condujeron a resolverlos. Por último, deben elaborarse informes dirigidos a individuos bien identificados y a un comité de administración de calidad interno.

4.- Evaluación de la calidad

Es realizada a través del control de calidad interno y externo.

El laboratorio debe definir para cada prestación límites y acciones correctivas a efectuar cuando un análisis cae fuera de los límites definidos. Debe existir un registro claro y detallado de las observaciones y las acciones que se han tomado.

INFRAESTRUCTURA NECESARIA PARA IMPLEMENTAR UN SISTEMA DE MEJORÍA CONTINUA DE LA CALIDAD

¿Como hacerlo?

En Chile existe una amplia gama de laboratorios, clasificados en:

- a.) Laboratorios clínicos de establecimientos públicos (dependientes del Sistema Nacional de Servicios de Salud).
- b.) Laboratorios Delegados (aquellos que no dependen directamente del Servicio Nacional de Salud, pero que le prestan servicio a éste) como son laboratorios clínicos municipalizados y los pertenecientes a establecimientos de fuerzas armadas y de orden, entidades religiosas y universitarias.
- c.) Privados: clínicas y laboratorios clínicos particulares.

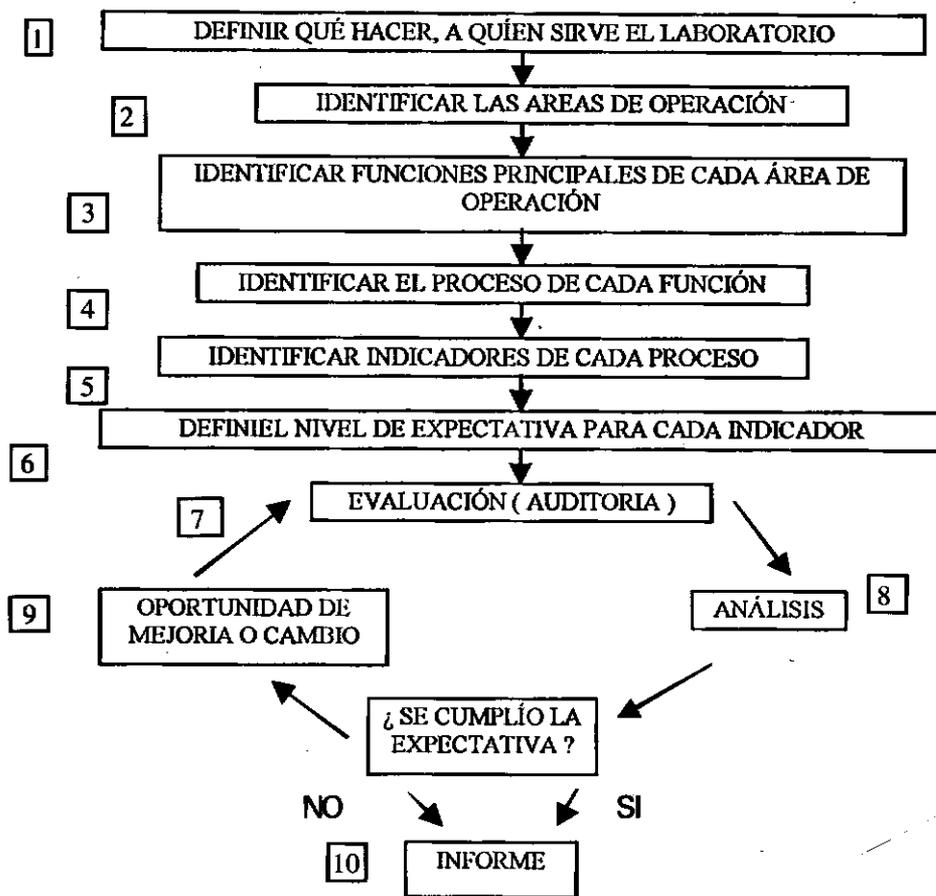
Dentro de cada una de estas categorías los laboratorios varían en tamaño, complejidad, número de pacientes que atienden, disponibilidad de recursos y personal.

Para algunos laboratorios será más fácil crear una infraestructura compleja de Mejoría Continua de la Calidad a corto plazo, sin embargo otros tendrán una visión más limitada comenzando por implementar sólo algunos aspectos críticos.

En la Fig. Nº 1 se esquematiza un enfoque simplificado, paso a paso, de mejoría continua de la calidad.

FIGURA Nº 1

ENFOQUE SIMPLIFICADO DE MEJORÍA CONTINUA DE CALIDAD
Mejoría Continua de la Calidad



Para la adecuada implementación de un sistema de mejoría continua de la calidad es necesario considerar los siguientes puntos:

1. Política de calidad

Es necesario definir la misión del laboratorio y por lo tanto diseñar los propósitos funciones, metas y objetivos. Un ejemplo simplificado:

Uno de los objetivos de un laboratorio clínico de un hospital tipo 1 (de mayor complejidad) es atender las necesidades de exámenes que requieren los servicios clínicos, unidades de apoyo clínico y otros, satisfacer la demanda de exámenes de urgencia las 24 horas de acuerdo a los recursos disponibles. Los resultados informados deben ser confiables, oportunos y realizarse en forma eficiente.

Observaciones: Identifica claramente a quién le presta servicio, cuáles son sus necesidades y las expectativas.

2. Identificación de áreas de operación

El laboratorio clínico, unidad de apoyo al diagnóstico, para cumplir las metas programadas deberá realizar los siguientes exámenes: bioquímicos, hematológicos, microbiológicos, inmunológicos, genéticos, parasitológicos endocrinológicos, virológicos, etc., y por lo tanto deberá contar con áreas separadas para efectuar los análisis de las distintas especialidades. La identificación de estas áreas permite que todo el laboratorio sea administrado con mayor eficiencia a través de la división de la organización en componentes más pequeños.

Observaciones: Deberán existir Secciones de: Bioquímica, Hematología, Microbiología, Banco de Sangre (el que puede o no depender administrativamente del laboratorio clínico), etc.

Un laboratorio pequeño cuyos funciones, objetivos y metas sean limitadas y esté dotado de poco personal puede realizar todos los análisis en una sola área física, siempre y cuando no infrinja las normas de bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio.

3. Identificación de las funciones principales dentro del área de operación

Ejemplo:

Efectuar los exámenes de la especialidad en forma eficiente y eficaz y cumplir con los siguientes procesos:

- Mantener actualizado el Manual de Procedimientos Técnicos y los Instructivos de Operación de Equipos de la sección, siendo responsabilidad de cada persona que intervenga en el trabajo operativo el estar en conocimiento de su contenido.
- Velar por el correcto funcionamiento de los instrumentos llevando un registro de mantención. Es conveniente incluir un programa de mantención preventiva.
- Adoptar las normas de bioseguridad necesarias en todos los procedimientos.
- Informar oportunamente los resultados de análisis efectuados en la sección.
- Informar periódicamente la estadística.
- Mantener en forma oportuna el abastecimiento, almacenamiento y conservación adecuado de insumos necesarios, según especificaciones técnicas.
- Tener implementado un programa de control de calidad interno para todas las determinaciones y técnicas analíticas realizadas. Efectuar y documentar las medidas correctivas realizadas en caso de estar fuera de control.
- Participar en programas de evaluación externa de la calidad organizado por el Instituto de Salud Pública, aquellos implementarlos a nivel regional (Reglamento Laboratorios Clínicos) y otras según disponibilidad.
- Colaborar con la jefatura en la determinación de necesidades de los recursos, planta física, equipamiento, personal e insumos.

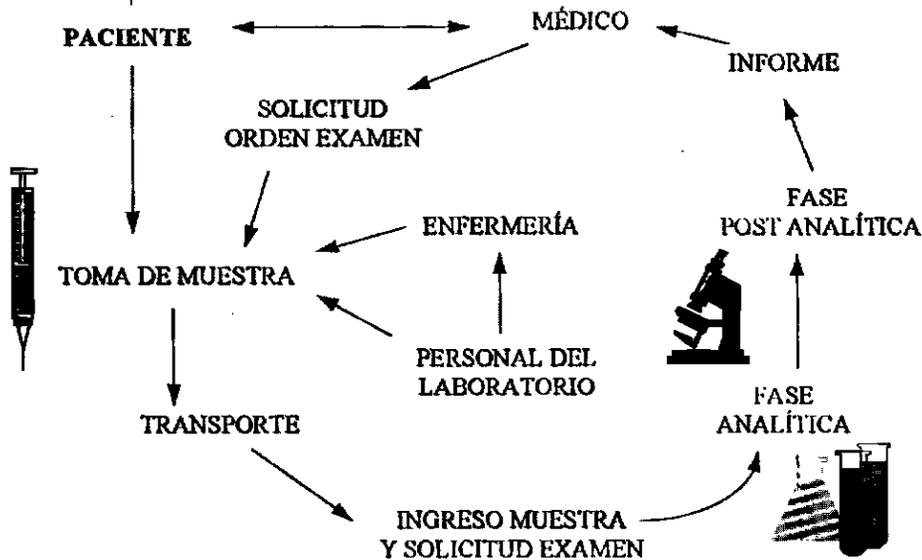
4. Identificar el proceso de cada función

Un **proceso** es una serie de actividades y comunicaciones interrelacionadas. Debe considerar desde la solicitud de determinación del examen a un paciente determinado hasta el momento en que los resultados son recibidos por el médico tratante.

5. Identificar indicadores críticos de los pasos de cada proceso

Es importante elaborar un diagrama paso a paso de cada proceso.

Figura Nº 2. **Diagrama de flujo de un examen**



Durante el proceso pueden producirse algunas variaciones en su calidad debida a causas especiales, por ejemplo descalibración de un instrumento. Con mayor frecuencia surgen variaciones en el desarrollo de actividades y comunicaciones producidas por situaciones al azar debido a defectos inherentes al proceso.

Una vez que se ha efectuado un protocolo anotando paso a paso las etapas del proceso, se decide qué partes deben monitorearse, es decir, cuales son los indicadores críticos de los pasos de cada proceso.

6. Definir el nivel de expectativas para cada indicador

Los indicadores de calidad son proporciones que relacionan de manera sistemática dos o más factores de interés cuyo cociente tiene un significado convencional.

Debe definirse qué se espera de cada indicador, considerando que estas razones por sí solas no significan nada.

Siempre tienen que compararse con:

- a. Una norma, una meta o un estándar.
- b. Razones o índices anteriores en el tiempo, para evaluar tendencias.
- c. Índices de otras instituciones similares o comparables.

El indicador es un marcador que identifica alguna característica especial de un servicio que necesite una revisión más cuidadosa.

Un indicador válido es capaz de identificar situaciones que requieran de mejorar en algún servicio o actividad.

Ejemplo de indicadores de calidad:

- i. *Enfocado hacia una etapa del proceso:*

Ejemplo:

Recepción de muestra.

$\text{N}^\circ \text{ de rechazos de muestras} / \text{solicitud total mensual} \times 100$

Número de solicitudes mensuales, considerando como causas de rechazo de muestras por ejemplo: presencia de interferentes con los métodos analíticos tales como, hemólisis, lipemia, muestras ictericas; presencia de pequeños coágulos que alteran los factores de coagulación en exámenes hematológicos; transporte inapropiado: considerando tiempo transcurrido, temperatura de transporte, derrames de muestras, proporción inadecuada de sangre v/s anticoagulante cuando se requiere plasma, entre otras.

ii. *Indicador de eficiencia orientado hacia el resultado:*

La demora promedio en la que se entrega un informe.
Número de prestaciones/dotación de personal (horas hombre).
Número de rechazo de muestras/ Número de solicitudes x 100.

Otros ejemplos de funciones del laboratorio clínico que ameritan investigarse y para los cuales se pueden desarrollar indicadores de calidad:

- Toma de muestras y procesamiento.
- Importancia clínica de los informes.
- Apreciación del desempeño.
- Control de calidad interno.
- Educación Continua, etc.

7. Evaluación, Auditoría

Es necesario que existan protocolos de análisis detallados para que los distintos observadores reúnan la misma información de la misma manera y se puedan realizar comparaciones de resultados en tiempos distintos ej.: métodos analíticos estandarizados.

Una auditoría de la calidad es un análisis sistemático e independiente que determina si las actividades relacionadas con la calidad y sus resultados cumplen con las políticas de calidad y metas propuestas, si se han implementado correctamente y si son útiles para lograr los objetivos deseados.

8. Análisis e informes

Los datos obtenidos deben analizarse para verificar si las expectativas se han cumplido. Estos resultados deberán difundirse entre todas las personas que participen en el proceso, por ejemplo: auxiliares de laboratorio, tecnólogos médicos, enfermeras, médicos, químicos farmacéuticos, bioquímicos y personal administrativo.

De este modo podrán enterarse todos los participantes de cómo progresa el proceso e involucrarse en parte de la infraestructura del Mejoramiento Continuo de la Calidad.

9. Identificar oportunidades de mejoramiento

Si no se cumplen las expectativas previstas, el personal deberá proponer modificaciones y hacer sugerencias para mejorar el desempeño, basándose en la información obtenida del indicador o del proceso analítico completo.

La efectividad de los cambios implementados deben ser medidos y analizados para visualizar si han tenido un impacto positivo sobre la calidad del servicio.

El proceso completo de mejoría continúa de la calidad puede tardar mucho tiempo y esfuerzo en ser implementado. Cada laboratorio deberá diseñar su propio programa de mejoría de la calidad de acuerdo a la realidad local.

BIBLIOGRAFÍA

General Requirements for the competence of calibration and testing Laboratories. ISO Guide 25, 3rd edition, 1990.

Mejoria Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina, Ed. Español: ML Castillo, ME Fonseca, en colaboración con COLABIOCLI. Editorial Medica Panamericana, 1995.

Whitehead, T.P. Principles of Quality Control, WHO Lab/76.1.

Hill, P., Uldall, A., Wilding, P. Fundamentals for External Quality Assessment (EQA), IFCC, 1993.

Garantía de Calidad en el Laboratorio Clínico. Hipolito Niño, Luis Becerra, Editorial Paramericana, 1ª edición, 1993.

MINSAL Reglamento de Laboratorios Clínicos DS N°433, Santiago, 1993.

Normas Técnico - Administrativas Laboratorio Clínico (en prensa), 1996.

Estructura para un Manual de Calidad de Laboratorio Clínico, Adam Uldall y cols, Informe provisional del proyecto NORDKEM para información comentarios y discusión.

Capítulo II

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS

Ingrid Heitmann Ghigliotto

MANUAL DE PROCEDIMIENTOS DE LABORATORIO

El *Manual de Procedimientos de Laboratorios* es una herramienta importantísima en la entrega de resultados consistentes desde el laboratorio.

Este manual documenta los métodos que se usan rutinariamente en el laboratorio y pese a que implica trabajo y tiempo en su preparación, es básico en el entrenamiento, capacitación y desempeño adecuado del personal, puesto que asegura que los exámenes son siempre realizados con la metodología exacta.

En el manual se debe documentar claramente la bibliografía de apoyo para el método usado y también debe permitir que las personas con más experiencia y conocimiento en las distintas áreas del trabajo de laboratorio traspasen ese conocimiento consistentemente y de la misma manera a todos los funcionarios en forma escrita, clara, concisa y precisa.

En la preparación del manual debe haber trabajo en equipo, todos los métodos que están siendo usados deben ser claramente sustentados, por lo tanto se lleva a efecto una revisión exhaustiva de ellos.

El diseño y organización del manual debe ser apropiado para cada laboratorio en particular y en este planteamiento debe buscarse la participación de todos los funcionarios.

Elementos a considerar en la fase de planeamiento

1. Formato:

Por ejemplo separarlo en volúmenes de acuerdo a las secciones o áreas de trabajo del laboratorio.

2. Numeración:

Debe ser hecha de tal manera que se puedan insertar páginas y procedimientos sin necesidad de cambiar los números de todo el manual. Para ello, no enumerar secuencialmente sino por procedimientos, dejando números sin usar y así, se puede

insertar procedimientos nuevos entre los ya existentes. Numerar los procedimientos 10, 20, 30 etc., en vez de 1-2-3- y las páginas serán, por ejemplo, 1.1, 2.2, etc.

3. Estilo:

Acordar por anticipado tipos de letra, tamaño, subrayado, tipo de títulos, etc., puesto que diferentes personas escribirán diferentes partes del manual.

4. Ensamblaje:

Que permita fácilmente añadir y remover páginas, con índice simple y separados.

Lo siguiente es un ejemplo de cómo dividir el manual en secciones y está basado en el documento NCCLS, dando sugerencias breves de lo que se incluye en cada sección.

SECCIONES.

1. Título:

Nombre de la Institución.
Título del procedimiento.
Autor del escrito.
Fecha de implementación.
Si reemplaza un procedimiento anterior.
Fechas de revisión y cambios (usualmente anual).
Firma del profesional autorizado para aprobar.
Nº de copias y localización en el laboratorio.



2. Principio:

Breve descripción de la teoría del examen y fundamento para hacerlo.

3. Requerimientos de la muestra y/o paciente:

Indicar instrucciones generales y, como por ejemplo, tipo o naturaleza, tiempo, volumen, anticoagulantes, condiciones de almacenamiento y transporte, etc.

4. Criterios para rechazo de muestra:

Listar las situaciones en que la muestra no será procesada y las razones técnicas de ello.

5. Medios, reactivos, equipos:

Lista de todos los materiales específicos necesarios para realizar el examen/procedimiento. Incluir almacenamiento, proveedores y N° de catálogo.

Si ciertos reactivos deben ser preparados en el momento, proveer instrucciones detalladas de preparación. Esta lista de reactivos debe incluir su concentración y su límite de tolerancia expresado en unidades del Sistema Internacional (SI), y su pureza si es posible.

6. Calibración de los instrumentos:

Indicar claramente el procedimiento para hacerlo.

7. Control de calidad:

Frecuencia de los controles, cepas y/o reactivos a usar.

Lista de parámetros aceptables.

Rango analítico: rango dentro del cual el método es aplicable sin introducirle modificaciones.

8. Métodos:

Describir el método paso a paso con instrucciones claras y específicas, indicando las etapas críticas (ej.: volumen, tiempos, temperatura, etc.). Dejar las explicaciones y significado para la sección «**Notas**».

9. Cálculo:

Incluir fórmula y ejemplo de cálculo matemático.

10. Informe de los resultados:

Usar palabras específicas para estandarizar y dar consistencia al informe (informes «tipo»).

Si es necesario, añadir notas explicativas para interpretación.

Incluir intervalo de referencia de la determinación correspondiente.

11. Notas sobre el procedimiento:

Explicaciones para ayudar al personal a comprender por qué las cosas se hacen de la manera descrita.

12. Limitaciones del procedimiento:

Indicar y explicar las situaciones que influyen en la exactitud de los resultados.

13. Seguridad:

En esta sección describir en forma clara y resumida cuales son los riesgos y peligros existentes en el procedimiento y las precauciones para evitarlos, no olvidar incluir procedimientos para descartar los desechos.

14. Referencias:

Lista de fuentes de información usadas para el desarrollo y las modificaciones al procedimiento. Incluye: libros, revistas, folletos del productor, manual de instrumentos, comunicaciones personales, estudios hechos en el laboratorio, etc.

BIBLIOGRAFIA

National Committee for Clinical Laboratory Standards, 1984. Clinical Laboratory Procedure Manuals.

Approved guideline vol 2-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, Pa.

Capítulo III

TOMA DE MUESTRAS

Valeria Cepeda Carrillo

TOMA DE MUESTRAS

En cada laboratorio debe existir un Manual de Toma de Muestras, en el que aparezcan claramente indicados los antecedentes que deben acompañar una solicitud de examen y las condiciones de obtención, almacenamiento, transporte de las diferentes muestras por analizar. Los resultados emitidos por el laboratorio están directamente relacionados a la calidad de las muestras recibidas.

FORMULARIO DE SOLICITUD DE EXAMEN

En la solicitud deben indicarse los siguientes datos:

- Nombre completo del paciente
- Fecha de nacimiento
- Nombre del establecimiento
- Servicio clínico, cuando corresponda
- Número de ficha, cuando corresponda
- Fecha de la solicitud y fecha de obtención de la muestra
- Sexo del paciente
- Examen solicitado
- Diagnóstico clínico
- Consignar si al paciente se le está administrando alguna droga, cuando corresponda
- Observaciones especiales, cuando corresponda (ej. antimicrobiano, citostático, corticoide, etc.).

OBTENCIÓN DE LA MUESTRA

1.- CALIDAD DE LA MUESTRA

Las muestras de sangre y orina constituyen la mayoría de las que se analizan en los laboratorios clínicos. La sangre puede considerarse como el líquido biológico en el que se pueden realizar un mayor número de análisis cuantitativos.

Antes de realizar cualquier análisis, debe asegurarse la adecuada calidad de la muestra. Los resultados analíticos efectuados sobre muestras mal extraídas son inútiles, confunden al clínico y algunas veces incluso son peligrosos para los pacientes implicados. La metodología analítica y la instrumentación no realizan ningún ajuste o compensación

de los factores interferentes; por consiguiente, es responsabilidad del analista velar para que las muestras analizadas estén libres de cualquier interferencia o deterioro.

Los requerimientos para una muestra adecuada son:

- a. Muestra correcta, del paciente correcto y etiquetada adecuadamente.
- b. Si es plasma, chequear el empleo del anticoagulante correcto. Si se necesita suero para el análisis, asegurarse que la muestra no es plasma.
- c. Ausencia de hemólisis.
- d. Sin turbidez.
- e. Muestra fresca. Si no es fresca, asegurarse que se ha almacenado adecuadamente.
- f. Añadir un conservante cuando se requiera para asegurar que el constituyente esté presente en la muestra analítica en la misma concentración que en el paciente.
- g. Si es una muestra que debe recolectarse durante un tiempo determinado, asegurarse que sea el correcto.
- h. Preparación adecuada del paciente antes de efectuar la toma de muestra.
- i. Evitar, en lo posible, la interferencia de drogas administradas al paciente.

2.- PREPARACIÓN DEL PACIENTE

Deben existir instrucciones detalladas escritas tanto para el paciente como para el Servicio de Toma de Muestras. Estas deben ser explicadas verbalmente al paciente.

3.- IDENTIFICACIÓN

Debe existir estricta relación de identidad entre el etiquetado de la muestra, el formulario de solicitud y el paciente.

4. CONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO

En los laboratorios hospitalarios, la mayoría de los análisis se realizan en las horas siguientes a la obtención de la muestra y los resultados se informan en el mismo día para la mayoría de los análisis de rutina. Sin embargo, si las muestras deben guardarse por cierto tiempo o enviarse a otros laboratorios, deben adoptarse ciertas medidas de pre-

caución para conservar el o los componentes a analizar para evitar: contaminación o crecimiento bacteriano, deterioro del o los componentes, generación de sustancias interferentes.

La contaminación bacteriana comienza poco después de la obtención. El crecimiento que ocurre en 24 horas a temperatura ambiente puede considerarse despreciable en el análisis químico, pero no así en el bacteriológico. El desarrollo bacteriano puede prevenirse por refrigeración de la muestra cuando sea posible, alterando el pH a un nivel mayor o menor o añadiendo un agente antimicrobiano. Se recomienda guardar el suero o plasma congelado a -20°C después de 5 días.

5.- TRANSPORTE

El traslado adecuado de las muestras, desde el lugar de obtención al laboratorio es un factor que puede ser decisivo en los resultados analíticos. Las normas para llevarlo a cabo pueden tener algunas condiciones diferentes dependiendo de si este traslado se realiza dentro del mismo establecimiento, desde un laboratorio a otro o a través de correo.

El transporte de muestras biológicas potencialmente infecciosas deberá cumplir los siguientes requisitos:

- La muestra debe obtenerse en un envase hermético.
- Este envase debe introducirse dentro de un recipiente secundario irrompible.
- Entre el envase primario y el secundario, deberá disponerse material absorbente para amortiguar golpes y capaz de absorber todo el líquido de la muestra en caso de ruptura del primero.
- El envase final deberá rotularse como material biológico. También deberá indicarse como material perecible, orientación, temperatura de almacenamiento, urgencia de entrega.
- Un formulario con los datos de la muestra, el destinatario y el remitente deberá adherirse al envase final. Copia del mismo deberá guardar el remitente.
- Abrir los envíos de sustancias contaminantes en gabinetes de seguridad.

A. Transporte dentro del mismo establecimiento:

- **Tiempo:** Dentro del hospital las muestras deben ser trasladadas al laboratorio tan pronto como sea posible; evitar temperatura ambiente mayor de 30°C.
- **Posición de los tubos:** Los tubos que contienen la muestra deben mantenerse en posición vertical, ya que si se trata de sangre se estimula la completa formación de coágulo, cuando es necesario, y se reduce la agitación del contenido del tubo, lo que puede producir una eventual hemólisis; además se minimiza la posibilidad de pérdida accidental del tapón. Por otra parte, si se trata de muestras para exámenes bacteriológicos así se evita cualquier contacto con el tapón, lo que podría inducir una eventual contaminación.
- **Exposición a la luz:** Evitar la exposición a la luz cuando se requiere cuantificar constituyentes fotosensibles. En estos casos es necesario proteger la muestra con papel de aluminio.
- **Temperatura:** La temperatura de transporte dependerá del tipo de muestra y examen solicitado.

B. Transporte desde otro laboratorio:

- En general se deben tomar las mismas precauciones que para el traslado dentro del establecimiento
- Si no es posible cumplir con todas las condiciones, es recomendable separar el suero o el plasma, antes de enviar al laboratorio. En este caso se debe considerar todas las indicaciones dadas para el almacenamiento de muestras de suero o plasma.
- Algunas muestras sólo se deben recolectar en el laboratorio donde se realizará el análisis.
- Las muestras de bacteriología deben seguir además los procedimientos escritos del Manual de Toma de Muestras específico de cada laboratorio.

C. Transporte por servicio de correos u otros:

Para transportar las muestras, desde un lugar lejano al laboratorio donde se realiza-

rán los análisis, se debe poner especial atención en las indicaciones colocadas en el embalaje sobre el manejo de las muestras, para asegurar la estabilidad del constituyente que se desea medir.

D.- Registro.

Debe existir un libro de registro en el que se inscriba los datos de cada muestra.

E.- Criterio de rechazo de muestras

Bajo las siguientes condiciones las muestras no deben ser aceptadas para su análisis:

- Identificación inadecuada
- El recipiente que contiene la muestra no está etiquetado, o es ilegible.
- Inadecuado volumen en un tubo en proporción al aditivo.
- Uso de tubo de recolección erróneo.
- Hemólisis.
- Transporte inapropiado (ej. Tapones mojados, tubos quebrados, temperatura, tiempo, etc.).

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE SANGRE

1. ANTICOAGULANTE

La confusión en cuanto al tipo y cantidad de anticoagulantes a emplear con las muestras de sangre que serán sometidas a distintos análisis del laboratorio clínico se ha solucionado en gran medida desde que se ha adoptado ampliamente los tubos al vacío. Estos tubos se suministran con la cantidad correcta de anticoagulante según sea el tipo de análisis en el que se van a emplear. Debido a que están codificados por colores de acuerdo al anticoagulante que contienen, es bastante fácil para el técnico relacionar el tubo con el análisis. El laboratorio sólo tiene que indicar el tipo de tubo a emplear en cada caso.

Existen, además, exámenes específicos que requieren de anticoagulantes especiales y esto es importante tener en cuenta, dependiendo de la especialidad del laboratorio. Ej: inmunidad celular en inmunología.

Si se tiene que hacer un análisis en el plasma observar las siguientes reglas:

- No deben realizarse análisis de la concentración de sodio en el plasma cuando se ha empleado como anticoagulante una sal de sodio. Lo mismo es válido para las determinaciones de potasio, amonio y litio.
- Las determinaciones de calcio no deben realizarse con plasma que contengan EDTA, fluoruro u oxalatos, porque se combinan con el calcio formando complejos o materiales insolubles.
- Los fluoruros y oxalatos no deben emplearse en los análisis de enzimas, ni en técnicas cuyo fundamento incluya procesos enzimáticos.

2. HEMÓLISIS

La hemólisis es una de las interferencias más frecuentes que ocurren en el análisis en el laboratorio clínico. La hemólisis proviene de factores mecánicos en la toma de muestra y durante su procesamiento e interfiere con el análisis de dos formas:

- La hemoglobina presenta la mayor absorbancia a 431 y 555 nm. Si la sustancia a analizar se mide espectrofotométricamente alrededor de estas longitudes de onda, la absorbancia de la hemoglobina puede causar resultados falsamente elevados.
- La concentración de diversos constituyentes en los eritrocitos y en el plasma difieren, por tanto se recomienda no utilizar plasma hemolizado.

RECOLECCIÓN Y TRANSPORTE DE MUESTRAS PARA PRUEBAS DE COAGULACIÓN

Para las pruebas de coagulación la obtención de la sangre debe realizarse por medio de una punción venosa muy cuidadosa para evitar contaminación con factor tisular, incluso se aconseja utilizar sistema de doble jeringa, así el contenido de la primera serviría para realizar otro tipo de análisis de laboratorio y el de la segunda para los de coagulación. Esta recolección debe cumplir, además otras condiciones.

- El tubo en el cual se reciba la sangre debe ser de material plástico, para evitar la activación del sistema de coagulación.
- El anticoagulante utilizado debe ser citrato de sodio dihidrato en una concentración de 109 o 129 mmol/L (3.2% o 3.8%) en una proporción de 9:1 sangre/

- anticoagulante. Esta cantidad de anticoagulante debe ser ajustada en el caso de pacientes con hematocritos superiores a 55%.
- El plasma debe ser separado por centrifugación, a mínimo 1000xg por 10 minutos a 4°C antes de 1 hora después de la obtención. Una vez extraído traspasarlo a otro tubo plástico y mantener tapado refrigerado o en hielo picado hasta el momento del análisis.
 - Si las pruebas no son realizadas dentro de las 4 horas el plasma debe ser congelado, por lo menos a -20°C.

RECOLECCIÓN DE MUESTRAS DE ORINA

La exactitud del resultado de un análisis de orina depende de la calidad de la muestra, del correcto procedimiento de obtención y transporte al laboratorio.

Una adecuada muestra de orina debe cumplir ciertas condiciones:

- Debe ser recibida en el laboratorio tan pronto sea recolectada
- No debe permanecer más de 2 horas a temperatura ambiente antes de ser analizada, si esto no fuera posible debe ser refrigerada a 2 - 8°C.
- La muestra no debe presentar contaminación con fecas ni contener materiales extraños como restos de papel higiénico.
- Cuando el análisis solicitado es un estudio microbiológico, el recipiente de recolección debe estar estéril, y debe ser orina de segunda micción.
- En general se recomienda que la muestra sea recolectado de la primera orina de la mañana.

RECOLECCIÓN DE MUESTRA PARA ESTUDIOS COPROPARASITARIOS

La recolección debe hacerse en un envase adecuado para muestras de deposición: 3 frascos de boca ancha, desechables de 30 ml de capacidad o frasco de 100 ml para las 3 muestras y, siguiendo las instrucciones del Manual de Toma de Muestras.

Capítulo IV

**MANTENCIÓN Y CONTROL DE
EQUIPOS Y ACCESORIOS**



**Aurora Maldonado Ballestero, Rosario Lepe Lepe,
María Soledad Prat Miranda**

MANTENCIÓN Y CONTROL DE EQUIPOS Y ACCESORIOS

Debe existir un control programado del instrumental y accesorios a fin de garantizar su correcto funcionamiento. Este control debe ser realizado en forma periódica y regular, aún cuando se encuentren funcionando satisfactoriamente y su resultado debe registrarse adecuadamente en cartillas, diseñadas para cumplir con el objetivo.

Los equipos que se utilizan en el laboratorio tienen una influencia directa en la calidad de los resultados producidos. La calidad final del análisis depende siempre del buen uso y funcionamiento del equipo.

EQUIPOS	PROCEDIMIENTO	FRECUENCIA	LIMITES DE TOLERANCIA	RECOMENDACIONES
1.- Autoclave	Registro de temperatura	Cada vez que se use	121°C ± 1°C 115°C ± 1°C 105°C ± 1°C	1.-Registrar la presión cada vez que se use 2.-Utilizar tiras indicadoras de calor cada vez que se use. 3.-Registrar t° máxima y mínima, semanalmente. 4.-Utilizar 1 vez al mes (Semanal dependiendo del uso) tiras de esporas o suspensión de esporas (control biológico). 5.-Limpiar diariamente el interior del autoclave
2.-Baño María	Registro de temperatura	Diariamente	Según la t° ± 1°C	1.-Limpiar mensualmente. 2.-Usar sólo agua destilada para llevar al nivel.
3.-Centrifugas	Controlar revoluciones con tacómetro Registro de temperatura	Mensualmente Cada vez que se use Revoluciones: ± 3%	Dentro del 5% indicado en el dial Temperatura: ± 1°C	1.-Verificar cada 6 meses el peso de los capachos. 2.-Verificar el control del rotor por medio de un velocímetro con diferentes cargas y con suficiente frecuencia para asegurar campos de gravedad adecuado. 3.-La tara de los tubos debe ser rigurosa.

EQUIPOS	PROCEDIMIENTO	FRECUENCIA	LIMITES DE TOLERANCIA	RECOMENDACIONES
4. Congeladores	Registro de temperatura	Diariamente	Temperatura $\pm 2^{\circ}\text{C}$	1.- Tener sistema de alarma. 2.- Limpiar cada 6 meses. 3.- Termómetro máx. y mín.
5.- Pipetas y micropipetas	Calibración volumétrica y lubricación	Mensualmente		
6.- Homos esterilizadores	Registro de temperatura	Diariamente	130°C $\pm 5^{\circ}\text{C}$ 240°C $\pm 5^{\circ}\text{C}$ (para patógenos)	1.- Limpiar mensualmente. 2.- Utilizar tiras indicadoras de calor. 3.- Utilizar control con tiras o suspensión de esporas de <i>Bacillus stearothermophilus</i> semanal o mensualmente.
7.- Gabinetes de seguridad	Medir velocidad de aire a través de la abertura frontal	Trimestralmente	Flujo de aire: 50 pies por minuto $+5$ pies	1.- Limpiar filtros cada 3 meses. 2.- Verificar pérdidas y velocidad de flujo de aire mensualmente. 3.- Descontaminación periódica con formalina.
8.- Flujo laminar	-Control técnico -Control bacteriológico	Cada 6 meses Cada 3 meses		1.- Ubicación en lugar de poco tránsito. 2.- Usar luz ultravioleta a diario, antes y después de uso.
9.- Incubadoras	Registro de temperatura	Diariamente	Temperatura 35°C $\pm 1^{\circ}\text{C}$ Temperatura 45°C $\pm 1^{\circ}\text{C}$ Temperatura 22°C $\pm 1^{\circ}\text{C}$	1.- Si no se utiliza termómetro de registro, anotar temperatura diariamente en la mañana. 2.- Termómetro máxima-mínima.
10.- Incubadora de CO2	Determinación del contenido CO2 -Registro de temperatura	Diariamente	5% - 10%	Efectuar control biológico con <i>Neisseria gonorrhoeae</i>

EQUIPOS	PROCEDIMIENTO	FRECUENCIA	LIMITES DE TOLERANCIA	RECOMENDACIONES
11.-Jarras de anaerobiosis	Tira de azul de metileno	En cada uso	Viraje de azul a blanco indica baja tensión de O ₂	1.-Regenerar el catalizador a 160°C durante 1.5 - 2 horas en homo.
	Cultivo de Clostridium novyi	Periódicamente	Desarrollo: Indica baja tensión de O ₂	2.-Una vez regenerado el catalizador conservar en recipiente hermético que contenga un desecador.
12.-Medidor	Pruebas con soluciones	En cada uso	± 0.1 unidad	1.-Colocar fecha en las soluciones tampón cuando se abren por 1ª vez. 2.-Controlar, si es posible con otro medidor de pH una vez al mes. 3.-Descartar la solución tampón si el pH tiene una variación mayor ± 0.4. 4.-Verificar la integridad de los electrodos cada vez que se utilicen.
13.- Destiladores	Control de pH Limpieza	Diariamente Mensualmente	6.5 ± 0.5	Seguir instrucciones del fabricante
14.- Refrigeradores y cámara fría	Registro de temperatura	Diariamente	2 - 8°C	1.-Limpiar y descongelar mensualmente. 2.-Si es posible conectar a sistema de alarma. 3.-Termómetro máxima mínima.
15.- Balanza analítica	Pesas certificadas	Mensualmente	Revisar instrucciones	1.-Limpiar mensualmente las balanzas y las pesas. 2.-Descartar pesas alteradas.
16.- Microscopio	Lectura de láminas controles	Cada 6 meses		1.-Limpiar después de utilizar. No dejar restos de aceite en los objetivos 2.-Mantenión y limpieza general cada 6 meses. 3.-Proteger diariamente del polvo.

Capítulo IV: *Mantenimiento y Control de Equipos y Accesorios*

EQUIPOS	PROCEDIMIENTO	FRECUENCIA	LIMITES DE TOLERANCIA	RECOMENDACIONES
17.- Microscopio de fluorescencia	Lectura de láminas Controles	Cada vez que se use		1.-Mantener recomendaciones anteriores 2.-Registrar el N° de horas de uso de la lámpara de mercurio.
18.-Lavadores para ELISA	-Control de la bomba de aspiración. -Calibración de volúmenes del dispensador. -Control mecánico.	Mensualmente		
19.-Criostato	- Controlar temperatura - Control técnico - Control grosor corte del tejido por microscopio	Diariamente Cada 6 meses		-Colocar en lugar de poco tránsito
20.- Densitómetro	-Incluir un suero control normal -Chequear linealidad y respuesta de la luz visible - Incluir filtro adecuado según la determinación - Control técnico	Cada vez que se utiliza Según Manual correspondiente Cada vez que se use Cada 6 meses		-Instalar en red eléctrica con variación máxima de 5%
21.- Nefelómetro	- Calibrar y chequear el sistema óptico. - Controlar valor blanco de las cubetas en uso (A < 0.1). - Observar que los tubos de succión estén colocados en las botellas correspondientes (tampón diluyente y solución de lavado). - Control técnico	Cada vez que se usa Cada 6 meses		- Instalar una red eléctrica con variación máxima de 5%
22.-Contador hematológico	- Usar controles de concentración alto, medio y bajo. - Control técnico	Diariamente Cada 6 meses		- Lavar y desinfectar apropiadamente después de cada uso.
23.-Cámara electrofórica	- Cambiar el tampón de la cámara cada 5 corri-			- Limpiar semanalmente según instrucciones del manual.

EQUIPOS	PROCEDIMIENTO	FRECUENCIA	LIMITES DE TOLERANCIA	RECOMENDACIONES
	das. - Utilizar suero control cada vez que se use.			
24.-Fuente de poder	-Mantener limpieza - Control técnico	Mensualmente Cada 6 meses		1. Conectar a tierra. 2. Instalar una red eléctrica con variación máxima de 1-2%.
25.- Espectrofotómetro	-Verificación de la calibración de longitud de onda. -Verificar alineación de la lámpara -Documentar tiempo de uso -Verificar exactitud fotométrica.	-Una vez al mes y cada vez que se traslade el equipo -Cada vez que se cambie la lámpara y al trasladar el equipo. -En cada uso -Cada 6 meses		1.- Usar soluciones calibradas. 2.- Solicitar servicio técnico. 3.-Cambiar la fuente luminosa después del tiempo de uso recomendado por el fabricante. 4.-Usar soluciones calibradas recomendadas.
26- Colorímetro	-Cumplir especificaciones espectrofotómetro excepto la referencia a calibración de longitud			

NOTA: Para los instrumentos ya especificados y otros, es de importancia fundamental leer y seguir las instrucciones del manual del fabricante. Se recomienda para limpieza de todo equipo metálico, alcohol 70^o por su poder abrasivo y no corrosivo. Usar detergentes neutros y abundante agua. Exigir siempre el Manual de Instrucciones al comprar un instrumento.

BIBLIOGRAFIA

Quality Management Of Diagnostic Microbiology. Ed. Harold Richardson. Laboratory Proficiency Program y Ontario Medical Associaton, Ontario Canada 1992.

Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina, Ed. Español: ML Castillo, ME Fonseca, en colaboración con COLABIOCLI. Editorial Medica Panamericana, 1995.

Henry D. Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington,DC, American Society for Microbiology, Vol 1-2, 1992

Capítulo V

PARASITOLOGÍA

Berbeli Astorga Leiva

CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO DE PARASITOLOGÍA

La calidad de las prestaciones en parasitología dependen de la existencia de un laboratorio para especificar la existencia de material de referencia como: fotografías, diapositivas, muestras microscópicas negativas y positivas.

La confiabilidad de los exámenes de laboratorio puede garantizarse manteniendo una vigilancia permanente sobre diversos factores que pueden influir en una muestra, para ello se debe tener amplio conocimiento de las variaciones administrativas, biológicas y analíticas que puedan influir en el resultado final, ya que cualquiera de ellas aleja el diagnóstico real que presenta el paciente en el momento de la(s) toma de muestra(s).

FUENTES DE VARIACIÓN EN EXAMEN COPROPARASITOLÓGICO

Además de las fuentes de variación propias de todas las disciplinas de laboratorio clínico, ya previamente discutidas, es importante destacar:

1.- Fuentes de variación biológica en el parásito:

- Escasa carga parasitaria
- Etapa del ciclo biológico
- Infección solo de machos
- Hora de toma de muestras.

2.- Fuentes de variación biológica en el hombre:

- Edad
- Sexo
- Estado nutricional
- Ingesta de bario, bismuto o antimicrobianos.

3.- Fuentes de variación analítica

- Materiales: Envases
 Reactivos y colorantes

- Muestras: N^o
Cantidad
Calidad
- Preparación: Homogenización
N^o preparaciones por muestra
Grosor del preparado.

PROTOCOLOS DE INFORMES DE PROBLEMAS TÉCNICOS

- Definición del problema
- Pasos a tomar para resolverlo
- Acción correctiva para evitarlo en el futuro
- Comentarios
- Firma responsable
- Fecha.

MATERIAL DE CONTROL

En cuanto al material de control se hace necesario e imprescindible aplicar controles biológicos al preparar nuevos colorantes y al efectuar tinciones de muestras problemas Ej.: Tener muestras (+) con **Cryptosporidium parvum**, realizar frotis y teñir con los nuevos colorantes junto con las muestras problemas, para asegurar el resultado y evitar falsos positivos o negativos.

En nuestro país el examen coproparasitológico seriado se realiza empleando soluciones fijadoras. En algunos países estos fijadores son controlados con cepas controles de protozoos vivos, antes de su comercialización. Si el laboratorio prepara sus propios fijadores y no tiene cepas controles, puede seguir las siguientes normas de Control de Calidad:

- 1.- Obtener sangre fresca con anticoagulante, centrifugar y separar la capa de leucocitos, la que debe tener un recuento alto.
- 2.- Mezclar 2g de muestras de deposición fresca, que no contenga elementos parasitarios, con varias gotas de los leucocitos obtenidos anteriormente.

3.- Agregar 10ml del fijador a controlar, (SAF, PAF, PVA, etc.) a la mezcla preparada y dejar actuar durante 30 minutos. Preparar varios frotis.

4.- Realizar las tinciones habituales.

5.- Si después de la tinción los leucocitos aparecen con su morfología típica, se podría asumir una buena fijación de los elementos parasitarios.

USO DE LAS SOLUCIONES FIJADORAS

Para una fijación adecuada es importante respetar el tiempo límite recomendado entre la eliminación de la muestra y la fijación en:

- Muestras líquidas, que contienen preferentemente trofozoítos, 30 minutos es el tiempo límite
- Muestras semiformadas, que pueden contener trofozoítos y quistes, 60 minutos es el tiempo límite.

CONTROL DE CALIDAD DE ALGUNOS PROCEDIMIENTOS PARASITOLÓGICOS

Procedimiento	Acción	Frecuencia	Observación
Toma de muestra * EPSD	Relación fijador/muestra	Mensual	% de muestras escasas. % de muestras excesivas.
	Homogenización	Mensual	Evaluar en cruces(+ /++ /+++) consistencia de la muestra.
	Instrucciones	Trimestral	Solicitar que un% de los pacientes repita verbalmente las instrucciones.
Método de Burrows (PAF)	Homogenización	Diaria	Distribución similar de los elementos parasitarios en las 4 preparaciones.
	Preparados entre láminas y laminillas	Mensual	% de muestras diluidas o con centradas por observación microscópica.
Método flotación 1.100 con sulfato de zinc.	Medir la densidad sulfato de zinc	Al prepararlo Antes del uso	Densitómetro de rango entre y 1.200.
Test de Graham	Instrucciones	Trimestral	Solicitar que un% de los pacientes repita verbalmente las instrucciones.
	Toma de las muestras	Mensual	% de las muestras rechazadas.
Tinción Ziehl Neelsen	Confección de frotis	Trimestral	% de las muestras diluidas % de las muestras concentradas por observación microscópica.
	Decoloración	Trimestral	Uso de control biológico.
	Lectura con medición (reglilla)	Cuando se necesite	Diagnóstico diferencial de especie.

Procedimiento	Acción	Frecuencia	Observación
Tinciones	Preparación colorante	Al prepararlo	Uso de control biológico
Tinción azul de Toluidina	Preparación reactivo sulfatación	Cada vez que se realice	Uso de control biológico
Observación sangre al frasco	Confección del preparado	Mensual	% de las muestras diluidas % de muestras concentradas por observación microscópica
Frotis sanguíneo	Tinción	Cada vez que se realice	Uso de control biológico
Micro strout	Centrifugación	Cada vez que se realice	Control de centrifuga Uso de control biológico
Diagnóstico	Observación microscópica	Mensual	Lectura en duplicado de diagnóstico por microscopía óptica y de fluorescencia.

* **EPSD: Examen Parasitológico Seriado de Deposiciones.**

CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO PARASITOLÓGICOS

Los laboratorios que trabajen con cultivo de parásitos deben realizar el control de calidad de sus medios, con las normas generales ya descritas y con cepas controles específicas.

Los medios deben ser controlados con las cepas ATCC (American Type Culture Collection).

CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO

Medio	Cepa Control	Resultado Esperado	Incubación
TYI - S - 33	Entamoeba histolytica HU-1CDC ATCC 30925	Desarrollo	37° C
	Entamoeba histolytica HK - 9 ATCC 30015	Desarrollo	37° C
Agar no nutriente suspensión E.coli ATCC 30010	Acanthamoeba castellani	Desarrollo	37° C tº ambiente
Offurt's	Trypanosoma ATCC 30160	Desarrollo	37° C

CONTROL DE CALIDAD DE LA OBSERVACIÓN MICROSCÓPICA

En los exámenes directos es fundamental disminuir la variabilidad entre profesionales en la observación microscópica. A continuación se describirán algunos métodos utilizados.

- Método estadístico:
 - Analiza sólo positivos mensuales y calcula promedio, desviación estándar y coeficiente de variación.
- Método de los análisis por duplicado:
 - Preparar 2 veces una misma muestra desde el procesamiento.

- Método de la muestra por azar:
 - Preparaciones dobles entre porta y cubreobjetos de una misma muestra, con diferente número correlativo.
- Método de incorporación de muestras de Referencia:
 - Incorpora a la rutina preparaciones del material de Referencia.

CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS SEROLÓGICOS COMERCIALES EN PARASITOLOGÍA

Uno de los aspectos fundamentales a considerar en el control de calidad del diagnóstico indirecto de las parasitosis, como se señaló anteriormente, es el control de los reactivos comerciales. Analizando diversos estudios realizados, se encuentran reactivos de la misma marca con diferente número de lote mostrando diferencias bastante significativas en relación a especificidad y sensibilidad.

En la evaluación de reactivos comerciales intervienen 3 niveles de control.

- 1. Control del productor.**
- 2. Control de laboratorio de referencia:**

Control con sueros de referencia
nacionales e internacionales.
Control con sueros (+) y (-).
Control con sueros con otras patologías.

- 3. Control del usuario:**

Confección de cartas controles
con sueros de referencia

En el uso de reactivos comerciales se recomienda:

- a.- Realizar inspección ocular del reactivo (envase original, limpieza de las soluciones, coloración correcta, ausencia de aglutinación, etc.).
- b.- Seguir estrictamente las instrucciones del productor en la realización de la técnica.
- c.- Probar el nuevo lote de reactivos con todas las demás condiciones del ensayo controladas y con los sueros controles en uso.

El control de calidad interno del usuario debe basarse en la exigencia de trabajar solo con reactivos comerciales controlados por un laboratorio de referencia o por un laboratorio independiente de conocida reputación. El profesional debe tener una capacitación en las técnicas serológicas, realizadas en control de calidad a los materiales, reactivos (conjugados), a los equipos y efectuar un análisis periódico de los resultados para detectar posibles errores y proceder a realizar las medidas correctivas en el menor tiempo posible.

En laboratorios especializados, con producción propia de reactivos, el control de calidad debe comenzar con el control a los animales de experimentación, a los medios de cultivo, a los antígenos, dilución óptima de trabajo de los conjugados (fluorescentes y enzimáticos), control de calidad de equipos (microscopio de fluorescencia, lector de ELISA, etc.).

En relación al diagnóstico serológico en parasitología, se analizarán algunas pautas de control relacionadas con el diagnóstico serológico de mayor difusión en el país, que es el tamizaje de enfermedad de Chagas que se realiza en los Bancos de Sangre de área endémica del país, que comprende entre I y la VI Región.

Un programa de control de calidad en diagnóstico serológico de la enfermedad de Chagas, contempla todos los aspectos anteriormente mencionados en el control de calidad de exámenes directos.

Casi la totalidad de los Bancos de Sangre emplean la ELISA como técnica tamiz. Algunas utilizan inmunofluorescencia indirecta, por lo tanto las actividades de control que se mencionan a continuación están dirigidas a la utilización de estas técnicas

Además de lo mencionado en el capítulo de control de calidad en virología, es importante recordar que en general, en el control de calidad del diagnóstico serológico influyen, entre otros aspectos: la capacitación, utilizar reactivos evaluados, el empleo de materiales de control, el diagnóstico con 2 o 3 técnicas y el control de equipos.

Algunos de los materiales de control utilizados son:

- Sueros de referencia
- Solución p-nitrofenol en microplaca
- Isotiocianato de fluorescencia en lámina
- Plantillas para control de micropipetas
- Balanza para control de micropipetas

Algunos aspectos a controlar en la técnica de inmunofluorescencia indirecta son:

- Control del antígeno (15-20 parásitos x campo microscópico)
- Control del conjugado (Título óptimo de trabajo)
- Control del microscopio
- Empleo de cartas control con sueros de referencia
- Control de observación (con muestras en duplicado o por otro profesional)

BIBLIOGRAFIA

Goddard M.J. A statistical procedure for quality control in diagnostic laboratories. *Bulletin of the World Health Organization*, 1980; 58: 313-320.

Washington J.A. Functions and Activities of the Area Committee on Microbiology of the National Committee for Clinical Laboratory Standards. *Clin. Microbiol. Rev.* 1991; 4: 150-155.

Smith J.W. Identification of Fecal Parasites in the Special Parasitology Survey of the College of American Pathologists. *A.J.C.P.* 1979; 72: 371-373.

Identification of Parasites by Caribbean Laboratories. *CAREC Surveillance Report*, 1980; 6: 1-5.

Soria E., Delgado A., Propuesta de un método estadístico para el control de calidad en el Laboratorio de Parasitología. Libro de Resúmenes VII Congreso Latinoamericano de Parasitología. 1985.

August M.J., Hindler J.A., Huber T.W., Sewel D.L., Quality Control and Quality Assurance practices in Clinical Microbiology. *CUMITECH 3 A.* 1980: 1-13.

Cura E.N., De Titto E.H., Segura E.L. Control de calidad del inmunodiagnóstico de la enfermedad de Chagas. *Manual de Procedimientos.* Instituto Nacional de Chagas, Buenos Aires, Argentina, 1994.

De Báez G.A., Control de Calidad Interno. Normas y Procedimientos. Colección Normatización y Salud. Lab. Ref. Bioquímico Clínico. Facultad de Ciencias de la Salud. Universidad Autónoma de San Domingo. Editorial Europa, Santo Domingo, 1989.

Hawthorne M., Chiodini R.L., Snell J.J., Moody A.H., Ramsay A., Parasitology: United Kingdom National Quality Assessment Scheme. *J. Clin. Pathol.* 1992; 45: 968-974.

Janitschke K., Martin H., Disko R., External Quality Assurance in the laboratory diagnosis of parasitic infections in Germany. *Med. Microbiol. Newsletter* 1994; 3: 272-278.

Cura E., Wendel S., Manual de procedimientos de control de calidad para los laboratorios de serología de los bancos de sangre. OPA, Washington, 1994.

Capítulo VI

INMUNOLOGÍA

**Darwins Castillo Alvarez, Lucia Neira Miranda,
Mitzi Reid Rettig, Carolina Valenzuela Barros**

CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO DE INMUNOLOGÍA

El conocimiento de las enfermedades inmunológicas derivado de la investigación básica y el avance tecnológico, ha llevado al desarrollo de nuevos métodos con mayor precisión y sensibilidad, lo que ha tenido un impacto en la morbilidad y mortalidad en estas enfermedades. También ha permitido una unión más estrecha con otras disciplinas del laboratorio clínico como bioquímica, microbiología, hematología e histología.

Actualmente, se dispone de un buen número de estándares de referencia en inmunología y alergología ofrecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Unión Internacional de Sociedades de Inmunología (IUIS) y la Asociación Internacional de Alergología e Inmunología Clínica (IAACI). El uso de preparaciones de referencias y estándares internacionales asegura la adecuada exactitud y comparación de los resultados con otros laboratorios.

En el laboratorio de inmunología el uso de estos materiales es particularmente importante en la cuantificación de proteínas y autoanticuerpos, donde las determinaciones se hacen por varios inmunoanálisis que varían grandemente en su sensibilidad analítica. Sin embargo, para aquellas determinaciones que involucran células o cultivos celulares, los estándares son aún escasos.

En este capítulo se revisarán los procedimientos para llevar a cabo adecuadamente un control de calidad interno de los métodos y de las determinaciones inmunológicas que se utilizan en el laboratorio de inmunología. En los capítulos precedentes ya se analizaron otros aspectos de la garantía de calidad de un laboratorio que deben considerarse en el análisis global de un programa de calidad.

CONTROL DE CALIDAD INTRALABORATORIO

La efectividad de un laboratorio clínico depende de varios factores incluyendo: 1) conocimiento general del estado patológico involucrado y selección adecuada del método a utilizar, 2) análisis de la calidad analítica de los métodos del laboratorio, 3) evaluación de los intervalos de referencias y su comunicación al clínico y 4) análisis e interpretación de los resultados del proceso total seleccionado.

INMUNOELECTROFORESIS - ELECTROFORESIS

Las técnicas de inmunolectroforesis y electroforesis requieren por parte del técnico de una adecuada práctica. Los siguientes parámetros son importantes a considerar para mantener la exactitud y precisión de estos métodos:

—Aplicación de la muestra. Variaciones en la aplicación puede conducir a errores significativos. Aplicar la muestra con plantilla en las condiciones indicadas por el fabricante.

—Cantidad muestra. En la inmunolectroforesis, la inadecuada cantidad de muestra puede afectar la relación equimolecular antígeno-anticuerpo alterando la posición, intensidad e interpretación de los arcos de precipitación.

En la electroforesis el uso de cantidad excesiva de muestra puede causar una coloración intensa después de la tinción, originando una ausencia de linealidad entre intensidad de color y concentración de proteína. La muestra debe aplicarse con micropipeta calibrada.

—pH del tampón: Debe aceptarse +/- 0,1 unidades del valor indicado. Un pH no adecuado puede llevar a una migración difusa o incompleta.

Es recomendable medir la conductividad del tampón, aceptándose una variación máxima del 10%. La solubilidad total del tampón asegura una conveniente conductividad.

—Tiempo real de migración electroforética. No debe ser superior a +/- 1 minuto del tiempo recomendado. La combinación de la correcta conductividad del tampón, voltaje de la corrida electroforética, calidad del soporte y del tiempo de electroforesis determina el grado de perfección en la separación de las diferentes fracciones proteicas. El suministro de energía por la red eléctrica debe ser estable, con una variación no mayor al 5%.

—La electroforesis debe incluir un suero control normal cada vez que se realiza una corrida.

—Evitar el uso repetido de las soluciones tampón, de tinción y lavado. No usar mas de 3 a 4 veces. Los tampones se contaminan con productos de descomposición electrolítica, las soluciones de tinción cambian pH y las soluciones de lavado se diluyen.

—Los tiempos de fijación, tinción y lavado deben variar en no más de 1 minuto del tiempo recomendado. El grado de transparencia y tinción residual del fondo están de-

terminados por estos factores.

—En la inmunoelectroforesis es importante la calidad, cantidad y aplicación de los antisueros monoespecíficos. Los antisueros deben mantenerse alicuotados y congelados en freezer a -20°C .

—La inmunoelectroforesis requiere incluir en cada corrida electroforética un suero control normal que asegure observar la normalidad en la forma y posición de los arcos de precipitación.

—La interpretación de los arcos de precipitación deben hacerse entre las 24 a 36 horas después de la corrida.

—La reproducibilidad de las lecturas del densitómetro deben comprobarse cada 15 días, leyendo una misma muestra de suero control a lo menos 8 veces en diferentes tiras obtenidas recientemente. La membrana tiende a decolorarse con el tiempo. La repetibilidad debe estar dentro del rango especificado por el fabricante.

INMUNOFIJACIÓN

En la inmunofijación se deben considerar algunos puntos indicados en la inmunoelectroforesis - electroforesis como por ejemplo: aplicación de la muestra, pH del tampón de corrida, tiempo de migración (calidad soporte, voltaje corrida y conductividad tampón), uso repetido de soluciones tampón, de tinción y lavado y la calidad, cantidad y aplicación de los antisueros monoespecíficos.

Además es necesario insistir en algunos parámetros críticos:

—Cantidad de muestra. Es necesario diluir las muestras que contienen una alta concentración de proteína monoclonal. No se detecta inmunoprecipitación en la zona con concentración alta de antígeno (prozona en exceso de antígeno), observándose una tinción marginal y una leve tinción central.

—Sueros controles. Deben incluirse controles anormales, que contengan componentes monoclonales de clase IgG, IgA e IgM, cada 15 días para observar el comportamiento individual de los antisueros monoespecíficos.

CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS EN LÍQUIDOS BIOLÓGICOS (Inmunoglobulinas, factores del complemento y otras)

La cuantificación de IgG, IgA, IgM, alfa-1-antitripsina, haptoglobina, proteína C reactiva, C3, C4 y otras proteínas en el suero u otros líquidos biológicos, se realiza

actualmente por métodos automatizados como la turbidimetría y nefelometría y en menor grado por inmunodifusión radial (IDR). La cuantificación de inmunoglobulinas y factores del complemento en líquido cefalorraquídeo, saliva, orina o líquido sinovial no es muy frecuente. Estas mediciones debieran realizarse por nefelometría si la muestra es clara y no demasiado viscosa, debido al requerimiento de un volumen pequeño de muestra.

El uso de anticuerpos monoclonales en la cuantificación de subclases de IgG tiene limitaciones, como por ejemplo: algunos anticuerpos monoclonales no forman complejos inmune que precipiten, haciendo difícil su uso en los métodos de nefelometría, turbidimetría e inmunodifusión radial y a veces la reactividad del AcMo puede ser influenciada por el alotipo de la subclase, requiriéndose una mayor cantidad del anticuerpo.

En ELISA, el principal problema de los AcMo es el uso como reactivo de captura, debido a su pérdida de actividad después de su adsorción a la fase sólida, además del error inherente a la gran dilución que necesita este inmunoanálisis y la excesiva manipulación que exige su protocolo.

Los antisueros deben ser monoespecíficos y dar una respuesta lineal en el rango de prueba del método analítico. La nefelometría y turbidimetría requiere de anticuerpos de mayor afinidad que los de IDR y debe haber ausencia de turbidez.

a. Inmunodifusión radial

Para el control de la inmunodifusión radial se recomienda tener presente las siguientes indicaciones:

- Seguir estrictamente las instrucciones suministradas por el fabricante.
- Realizar en duplicado curva estándar, controles y muestras.
- Las lecturas de los diámetros de los anillos de precipitación de la curva de referencia, controles y muestras debe realizarla el mismo técnico en el mismo momento para minimizar las variaciones del operador.
- Mantener gráficas de control de calidad (gráficas de Levy-Jennings) que permita un análisis diario del suero control y del método.
- El coeficiente de variación debe ser menor al 20%.
- Los resultados deben comprobarse por electroforesis e inmuno-electroforesis o inmunofijación.

—Seros con IgM monomérica (algunos casos de macroglobulinemia) muestran niveles demasiados altos de IgM, debido a que el estándar es IgM 19S que difunde más lentamente. Incluir control de IgM monomérica.

—La presencia de gran cantidad de factor reumatoideo IgG (7S) puede interactuar con el fragmento Fc de la IgG y producir complejos que difunden más lentamente que la IgG nativa, resultando una concentración menor de IgG.

—Es importante recordar que las muestras envejecidas pueden dar resultados de factores del complemento más alto.

b.- Turbidimetría

La turbidimetría debe considerar el control de los siguientes parámetros:

—Revisar y chequear el equipo antes de iniciar las determinaciones (nivel de tampón y diluyente, estado de las calibraciones, chequear número de lote de calibradores, controles y antisueros).

—Obtención de curva de calibración de acuerdo a instrucciones del fabricante.

—Incluir diariamente un suero control normal y anormal (con valores por debajo o sobre los niveles normales).

—No analizar sueros lipémicos o turbios.

—Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráficas de Levy-Jennings) del suero control para un análisis rápido y oportuno.

—No aceptar una variación mayor del 15% en el suero control.

—Los valores de inmunoglobulinas debieran ser comparables a la concentración de gamaglobulina medida por densitometría y chequeada por inmunoelectroforesis.

c.- Nefelometría

La nefelometría requiere controlar los siguientes parámetros:

—Revisar y chequear el equipo antes de iniciar las determinaciones (nivel de tampón y diluyente, estado de las calibraciones, chequear número de lote de calibradores, controles y antisueros).

—Trabajar con todos los elementos a temperatura ambiente (calibradores, controles, muestras, tampones, diluyentes).

—Conocer el "software" del sistema automático.

—Obtener curva de calibración de acuerdo a las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

- Incluir diariamente un suero control normal y uno anormal.
- No analizar sueros lipémicos o turbios.
- Sueros que contienen complejos inmunes o alta concentración de proteína monoclonal pueden precipitar con el tampón de nefelometría y alterar la exactitud del resultado. La muestra debe ser diluida.
- Registrar u obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráficas de Levy-Jennings) del suero control que permita un análisis rápido y oportuno.
- No debe existir una variación mayor del 15% en el suero control.
- Los valores de inmunoglobulinas debieran ser comparables a la concentración de gamaglobulina medida por densitometría y chequeada por inmunoelectroforesis.

ACTIVIDAD HEMOLÍTICA DEL COMPLEMENTO (CH 50)

Mide la capacidad del suero de producir la lisis de una suspensión normalizada de glóbulos rojos de oveja sensibilizados con su anticuerpo (hemolisina) en forma óptima. Es sensible a las variaciones de los reactivos utilizados y a las características de la muestra en estudio.

Es importante considerar algunos parámetros en el control de esta metodología:

- Los glóbulos rojos de ovejas deben ser frescos y provenir regularmente de un animal al que se ha estudiado en el laboratorio las características de sus eritrocitos, como contenido normal de potasio y marcadores de membrana.
- Asegurar la adecuada sensibilización de los glóbulos rojos con los procedimientos del laboratorio. Los glóbulos rojos sensibilizados frente al complemento deben producir una hemólisis del 50 al 70%.
- La calidad y titulación de la hemolisina debe ser realizada y probada por el laboratorio.
- Debe incluirse un suero normalizado, cuyo resultado no debe tener una variación mayor al 20%.
- Registrar u obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráficas de Levy-Jennings) del suero control.
- La muestra de suero debe ser conservada en el laboratorio a 4°C hasta su uso (debe estudiarse en el día). El suero debe obtenerse dentro de la primera hora posterior a la toma de la muestra de sangre. No congelar ya que produce cambios en la actividad.
- La presencia de crioglobulina da valores de actividad hemolítica baja.
- Realizar el procedimiento en tres diluciones de suero y en duplicado.

CRIOGLOBULINAS

La determinación de crioglobulinas en el suero se realiza por una prueba simple, pero que requiere algunas precauciones para obtener resultados válidos:

- La sangre debe recibirse en una jeringa o tubo a 37°C y mantener a esta temperatura hasta que se separe el suero.
- El suero debe separarse rápidamente por centrifugación a 37°C.
- La alícuota a 4°C debe observarse a lo menos por 72 horas.
- La determinación de proteína debe hacerse en el crioprecipitado convenientemente lavado a 4°C.

DETERMINACIÓN DE IgE TOTAL EN SUERO

La determinación de IgE total se realiza por radioinmunoprecipitación o prueba de doble anticuerpo, radioinmunoanálisis en fase sólida RIST competitivo, RIST no competitivo y ELISA. Los parámetros generales a considerar en el control de esta determinación son:

- Incluir un suero estándar secundario calibrado con un suero de referencia de la OMS.
- Incluir un suero control calibrado por el laboratorio.
- El resultado de la muestra debe ser el promedio de al menos dos aplicaciones.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) del suero control del laboratorio y del "kit" que permita un análisis oportuno.
- El coeficiente de variación debe ser menor al 15%

DETERMINACIÓN DE IgE ESPECIFICA

La IgE específica se determina preferentemente por radioinmunoanálisis en fase sólida (RAST) y ELISA. La estandarización de esta determinación ha sido difícil especialmente por las variaciones del alérgeno tanto en su composición química, como en su método de extracción (la mayoría de los alérgenos son actualmente mezclas crudas que contiene muchas proteínas y distintas formas de presentación) y la falta de material de referencia primario.

El control de calidad para las pruebas que determinan IgE específicas para alérgenos

es dificultoso debido a que cada alérgeno tiene su propia prueba y un control riguroso aumentaría considerablemente el costo de la determinación. Sin embargo, se debe asegurar la calidad de los reactivos y la identidad y propiedades de adsorción del alérgeno. Esto debe realizarse frente a un suero conocido que contiene anticuerpos IgE anti-alérgeno y con un suero de un dador no alérgico con elevados niveles de IgE total.

A pesar de las dificultades, el control de calidad de la determinación debe incluir:

- Suero control positivo (preferentemente un pool)
- Suero control negativo. Debe usarse un pool que tenga una concentración de IgE total similar a lo observado corrientemente en muestras de pacientes alérgicos (por ejemplo, > 100 UI/ml).
- Se recomienda incluir un segundo suero control negativo de sangre de cordón umbilical.
La sangre de cordón contiene muy baja concentración de IgE, que permite dar una basal en ausencia de IgE.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de los sueros controles que asegure un análisis en cualquier momento del proceso.
- El coeficiente de variación para todos los alérgenos debe ser < al 30%. La mayoría de los alérgenos en forma individual producen un coeficiente de variación < al 20%.
- La interpretación de los resultados debe considerar las limitaciones de la prueba.

DETERMINACIÓN DE AUTOANTICUERPOS

La determinación de autoanticuerpos se realiza preferentemente por inmunofluorescencia indirecta, ELISA, aglutinación de partículas de látex y aglutinación de glóbulos rojos de oveja sensibilizados (SCAT). En algunos casos por inmunodifusión doble, contraelectroforesis y electroinmunotransferencia (immunoblotting). En el ELISA ha sido muy valioso la disponibilidad de suero estándar de referencia (OMS - CDC).

Estudios interlaboratorios han mostrado la importancia de estos sueros de referencia, como por ejemplo la medición reproducible de anticuerpos anti-DNA. Sin embargo, es necesario tener en cuenta que muchos de estos sueros contienen otros anticuerpos no específicos que es necesario considerar en la detección rutinaria de autoanticuerpos.

a.- Inmunofluorescencia indirecta

La inmunofluorescencia indirecta ha requerido grandes esfuerzos de estandarización.

Las evaluaciones interlaboratorio de anticuerpos antinucleares han mostrado variaciones de título de cuatro o cinco diluciones. Estas variaciones son debidas a los reactivos, equipos y subjetividad en la lectura del operador.

En los últimos años ha habido un gran avance en la estandarización utilizando conjugados de isotiocianato de fluoresceína (FITC) de referencia actualmente disponible en la OMS.

El procedimiento de inmunofluorescencia indirecta considera las siguientes variables en control interno:

- Debe conocerse la fuente, método de fijación, conservación y preparación del sustrato. El fabricante debe acreditar su calidad.
- Selección adecuada del sustrato para el “screening” de anticuerpos antinucleares. Se recomienda el uso de cortes de hígado de ratón o rata. También puede utilizarse cultivos de células, como Hep-2 que tiene una basal fluorescente más alta que los cortes de tejido.
- Incluir reactivos de referencia. Estos reactivos deben ser usados para identificar sueros estándares del laboratorio y para validar el procedimiento en uso.
- Incluir sueros controles:

 - Positivo débil, permite trabajar en un nivel aceptable de sensibilidad.
 - Positivo moderado, permite asegurar una adecuada especificidad.
 - Negativo.

- Las muestras deben aplicarse inicialmente en dos diluciones, por ejemplo 1/20 y 1/100.
- Utilizar conjugado anti-Igs humana-FITC con relación F/P 2 a 3. Confirmar especificidad y sensibilidad. Debe estar estandarizado frente a un conjugado de referencia. Usar en dilución de trabajo determinada por el laboratorio.
- Elegir adecuadamente los tiempos de incubación y lavado.
- Usar líquido de montaje con pH alrededor de 9. Asegura estabilidad del conjugado.

b.- ELISA

El método de ELISA es un procedimiento de múltiples pasos que deben controlarse adecuadamente para obtener el máximo rendimiento en precisión y exactitud. Existen varias razones que deben considerarse en la elaboración o adquisición de un "kit" de ELISA antes de ser utilizado en la rutina diagnóstica de determinación de autoanticuerpos: procedencia, caracterización y pureza del antígeno, agente bloqueante que no debe contener proteínas que puedan reaccionar con anticuerpos presentes en el suero humano y uso de un correcto conjugado, clase inmunoglobulina que detecte todas las clases relevantes de anticuerpos.

Para un adecuado control de la técnica de ELISA debiera considerarse los siguientes parámetros:

- Incluir sueros de referencias o calibradores.
- Incluir controles positivos y negativos. Independiente de los controles comerciales que se utilicen. Cada laboratorio debe establecer sus propios sueros controles siguiendo los protocolos en uso.
- Los sueros de referencias, controles y muestras deben aplicarse siempre en duplicado.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de los sueros controles.
- Los valores de absorbancia varían con la temperatura y el tiempo de incubación, por tanto se recomienda trabajar a temperatura ambiente (22 a 24°C).
- Los reactivos blancos debieran en general dar absorbancias menores de 0.150.
- Asegurar que la dilución inicial del suero problema no tenga significación clínica.
- Muestras que repetidamente dan absorbancias o resultados cercanos al valor de corte, deben repetirse con "kits" de otros fabricantes o con otra metodología.

c.- Aglutinación de partículas de látex

La aglutinación de partículas de látex para la determinación del factor reumatoideo es más sensible, pero menos específico que el SCAT. El látex es positivo en el 75% de los

pacientes con artritis reumatoidea y en el 5% de los individuos normales. También se observa reacciones falso positivas entre el 10 y 15% de los individuos normales de la tercera edad.

Existen muchos "kit" comerciales que muestran una gran variación en los resultados de una misma muestra y de diferentes laboratorios. Se ha determinado que estas variaciones residen en: diferentes características físicas de las partículas de látex, inestabilidad y falta de estandarización de la inmunoglobulina IgG adsorbida sobre el látex, falta de estandarización de sueros de referencia para uso intra e interlaboratorio, diferencias metodológicas (tubo, placa, etc.) y subjetividad del operador en la lectura del punto final de la aglutinación.

Para reducir las variaciones e incorporar adecuados controles es necesario:

- Incluir suero control positivo del laboratorio, previamente calibrado y estandarizado en UI/ml frente a suero de referencia de organismos internacionales.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de los sueros controles. La variación de los controles positivos no debe ser mayor al 20%.
- Expresar el resultado en UI/ml. Convertir la dilución a UI/ml.
- Incluir control positivo y negativo del "kit" correspondiente.
- Seguir estrictamente las instrucciones del fabricante.

d.- Aglutinación de glóbulos rojos de oveja sensibilizados (Sensitized sheepcell agglutination test, SCAT)

El SCAT es un procedimiento de laboratorio laborioso, difícil de estandarizar y con baja reproducibilidad. Sin embargo, es posible realizar un control riguroso en algunos factores:

- Los glóbulos rojos de oveja deben utilizarse antes de 15 días después de extraído.
- La sensibilización de los glóbulos rojos debe realizarse en el momento de realizar la técnica.
- Los sueros humanos deben absorberse con glóbulos rojos de oveja frescos.
- La dilución de trabajo para los anticuerpos anti-glóbulos rojos de oveja (hemolisina) debe ser determinada por el laboratorio.
- Debe incluirse sueros controles positivos previamente estandarizados con

- suelo de referencia expresados en UI/ml.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de los sueros controles. La variación de los controles debe ser menor al 20%.
 - Incluir sueros controles negativos.
 - Aplicar sueros en una serie de diluciones en duplicados.

ENUMERACIÓN DE LINFOCITOS B (LB), LINFOCITOS T (LT), SUB-POBLACIONES DE LT CD4 Y LT CD8 Y CELULAS "NATURAL KILLER" (NK)

a.- Citometría de flujo

La citometría de flujo permite analizar las propiedades, como tamaño y granularidad de cada célula que atraviesa un tubo u orificio en forma individual, a través de la dispersión de la luz de un rayo láser y la detección de fluorescencia. Permite detectar y cuantificar antígenos de superficie que caracterizan diferentes etapas del desarrollo del sistema inmune.

Esta es una metodología que tiene ventajas comparativas por su objetividad, sensibilidad y rapidez. En cada laboratorio debe ser lo suficientemente desarrollada y estandarizada para que permita interpretar sus resultados con confianza. Algunos parámetros importantes a controlar en esta técnica son los siguientes:

- Diariamente, antes de usar el citómetro de flujo realizar los procedimientos de control recomendados para el equipo (chequear lámpara, alineamiento óptico, intensidad fluorescencia, espectro de fluorescencia, otros).
- El recuento total de leucocitos se recomienda hacerlo en forma automatizada, considerando el control recomendado en el área de hematología.
- La fórmula diferencial puede realizarse en forma manual y automatizada. En los pacientes portadores del virus de la inmunodeficiencia humana se recomienda la forma manual debido a la variación en forma y tamaño que se observa en sus linfocitos. Mantener los controles de calidad que indica el área de hematología.
- Para muestras con recuento menor de 3.000 leucocitos/mm³ utilizar un volumen de sangre de 1,5 veces el normal, para recuento mayores de 12.000 leucocitos/mm³ usar un volumen de sangre 0,5 veces el normal.

- Incluir muestras en duplicado (a lo menos 2 muestras).
- Incluir diariamente un individuo normal caracterizado por el laboratorio o una muestra de referencia. El resultado debe estar dentro de la media ± 2 desviaciones estándar.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de la muestra normal.
- Muestras con EDTA o heparina analizadas dentro de las 24 horas no tienen diferencias significativas.
- Los laboratorios que realizan citometría de flujo deben disponer de valores de referencia para cada subpoblación de linfocitos T.
- Debe conocerse las variaciones en el tiempo de las subpoblaciones, en un grupo reducido de individuos normales que permita evaluar la integridad del procedimiento.
- Debe existir un programa regular de mantención y control del citómetro de flujo a través del servicio técnico autorizado.

b.- Inmunofluorescencia

La detección de células por inmunofluorescencia requiere de anticuerpos monoclonales marcados con un fluorocromo (FITC). Es un método que ha progresado en la estandarización, pero que está sujeto a la subjetividad de lectura del operador. Se recomienda controlar los siguientes parámetros:

- Separación de linfocitos y otras células por gradiente Ficoll-Hypaque y ajustar convenientemente la concentración celular.
- Determinar actividad, dilución de trabajo y cantidad del conjugado a utilizar en el laboratorio.
- El recuento total de leucocitos se recomienda hacer en forma automatizada considerando el control que utiliza el área de hematología.
- La fórmula diferencial puede realizarse en forma manual y automatizada. Mantener los controles de calidad que indica el área de hematología.
- Analizar muestras en duplicado.
- Incluir diariamente una muestra normal caracterizada por el laboratorio o una muestra de referencia. El resultado debe estar dentro de la media ± 2 desviaciones estándar.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-

Jennings) de la muestra normal.

- Para la detección de linfocitos B por inmunoglobulinas de superficie, utilizar Conjugados F(ab)₂. Evita unión IgG entera a receptor Fc.

c.- Células formadoras de rosetas

Las células T fueron las primeras en identificarse por su capacidad para unir glóbulos rojos de oveja y formar rosetas. Actualmente, aún se utiliza en el laboratorio de inmunología para enumerar linfocitos T y a pesar de su mayor normalización, requiere de un control en:

- Obtención y preparación de células mononucleares. Controlar gradiente de Ficoll-Hypaque. Eliminar contaminación de monocitos. Ajuste adecuado de la concentración celular.
- Comprobar la obtención y conservación de los glóbulos rojos de oveja. Usar dentro de 15 días de extraídos.
- El recuento total de leucocitos se recomienda realizarlo en forma automatizada considerando el control que utiliza el área de hematología.
- La fórmula diferencial puede realizarse en forma manual y automatizada. Mantener los controles de calidad que indica el área de hematología.
- Analizar muestras en duplicado.
- Incluir diariamente un control normal caracterizado por el laboratorio o una muestra de referencia. El resultado debe estar dentro del rango de la media ± 2 desviaciones estándar.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de la muestra normal.

ESTUDIO FUNCIONAL DE CELULAS B Y T

El estudio de la función de linfocitos, monocitos, macrófagos, y granulocitos tienen actualmente dificultades en la estandarización de las pruebas, debido a la gran variación biológica, complejidad metodológica e imprecisión en muchos procedimientos.

a.- Activación de células B y T con lectinas no específicas de planta (mitógenos) y proliferación de linfocitos T frente a antígenos específicos

Esta metodología requiere controlar y conocer algunos parámetros que asegure disminuir su gran variación.

- Mantener los sueros congelados hasta su uso.
- Si se usa vacuna, utilizar antígeno muerto.
- El laboratorio debe tener valores de referencia de individuos normales hacia aquellos antígenos más frecuentemente utilizados.

d.- Producción factor inhibidor migración (MIF)

Es una prueba que tiene poca estandarización, pero en la que es posible considerar algunos parámetros para un adecuado control:

- La cantidad de antígeno o mitógeno (PPD, PHA, ConA) a usar debe ser determinado en el laboratorio.
- La incubación requiere de un estufa a 37°C, con 5% de CO₂ y 95% de humedad.
- Se pueden obtener resultados falsos positivos por factores que inhiben directamente la migración al azar. Por ejemplo, complejos antígeno-anticuerpo, exceso de antígeno y otros.
- La determinación debe repetirse cuando no existe respuesta, para confirmar el resultado. Existe un 10% de falso negativo debido a variaciones individuales.
- Debe incluirse un individuo normal, cuyo resultado debe estar en el rango de la media +/- 2 desviaciones estándar.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de la muestra normal.
- Aplicar células del paciente y control en duplicado frente a cada antígeno o mitógeno.

e.- Pruebas cutáneas de hipersensibilidad tardía

Se deben considerar algunos elementos básicos en la realización y control de esta prueba:

- El infiltrado celular (mononucleares) se presenta 24 a 48 horas después de la inyección intradérmica de un antígeno.
- El criterio de prueba positiva de una reacción cutánea es de una induración de 5 mm de diámetro o más.
- Los antígenos para la prueba cutánea deben ser seguros, estables y efectivos.

- Resultados falsos negativos se obtienen con pacientes que reciben corticoides sistémicos.
- En pacientes que se sospecha una sensibilidad exagerada, se debe llevar a cabo una prueba preliminar con antígeno diluido.
- Confirmar hiporreactividad a un antígeno utilizando una mayor concentración.

f.- Sensibilidad de contacto, prueba con dinitro clorobenceno (DNCB)

El DNCB se ha usado en pruebas cutáneas para hipersensibilidad tardía, en pacientes que se sospecha anergia. Es un procedimiento que no se utiliza rutinariamente y es necesario tomar en consideración algunos parámetros en su control:

- Debe determinarse cuidadosamente las dosis de sensibilización y provocación del DNCB.
- La reacción de sensibilidad de contacto aparece después de 10 días y debe observarse en el sitio una mácula, pápula o vesícula.
- Debe evitarse reacciones falsas positivas que puedan producirse por una concentración muy alta de antígeno.
- Pueden observarse reacciones falsas negativas por aplicación de una baja concentración de antígeno.

ESTUDIO FUNCIONAL DE LOS GRANULOCITOS

Las pruebas de funcionalidad de granulocitos polimorfonucleares tiene un alto grado de complejidad. Las pruebas de quimiotáxis y fagocitosis se ven afectadas por el recuento de leucocitos totales, porcentaje de las poblaciones celulares en la muestra de sangre periférica, pureza de la población celular, procedimientos de trabajos, incorporación de controles adecuados en la determinación, eficiencia y capacidad del operador.

Quimiotáxis en agarosa, fagocitosis de levadura y prueba de reducción del nitroazul de tetrazolio (NBT)

Estos son métodos que no están suficientemente estandarizados, deben ser controlados en los siguientes parámetros:

- Los neutrófilos son extremadamente sensibles. Debe existir un manejo cuidadoso y sin movimientos bruscos.

- Se debe trabajar en plástico.
- El estudio debe llevarse a cabo antes de 2 horas después de la extracción de la muestra.
- Las suspensiones de células de pacientes con infecciones o elevados recuentos de leucocitos tienden a producir agregados que pueden interferir en los resultados.
- Evitar contaminación con glóbulos rojos.
- Ajustar convenientemente la concentración celular.
- Verificar la viabilidad celular por exclusión de un colorante vital.
- Estricto período de incubación.
- Un control normal debe incluirse cada vez que se hace o realiza la determinación para asegurar la aceptabilidad de la prueba y su resultado debe estar dentro del rango de la media \pm 2 desviaciones estándar obtenido para ese individuo.
- Obtener diariamente las gráficas de control de calidad (gráfica de Levy-Jennings) de la muestra normal.
- El laboratorio debe disponer de valores de referencia de estas determinaciones en individuos normales.
- En la quimiotáxis: la cantidad y dosis de factor quimiotáctico debe ser determinado por el laboratorio y la variación de la prueba es influenciada por la profundidad de la capa de agar y tamaño de los pocillos.
- En la fagocitosis: ajustar adecuadamente la concentración celular y la relación célula/levadura.
- En la prueba del NBT debe realizarse un control de funcionamiento de los reactivos utilizados.

BIBLIOGRAFÍA

Bloch K and Salvaggio J. Use and interpretation of diagnostic immunologic laboratory test. JAMA 1982; 248 (20):2734-58

Deverill Y. and Reeves W. Light scattering and absorption-developments in immunology J. Immunol.Meth 1980; 38: 191-204

Haynes D. and Homburger H. International standards and reference reagents for measurements of serum proteins and autoantibodies. Clin Immunol.Newsletter 1990;3:39-41

Kidd P. Gelman R. Paxton H. McKay L. Waxdal M and Valentine T. A review of the flow cytometry quality control program of the National Institute of Health AIDS Program. Clin. Immunol. Newsletter 1990; 10 (1): 8-10

Miyai K. and Price C. Problems for improving performance in immunoassay. JIFCC 1992; 4(4): 154-163

Organización Mundial de la Salud. Uso y Abuso de ocho procedimientos de diagnóstico muy difundidos en inmunología clínica Bol. Of Sanit. Panam. 1983; 94(1): 83-102.

Ownby D. In vitro allergy testing: quality control and result reporting. Clin. Immunol. Newsletter. 1990; 10 (2): 21-23.

Perelmutter L. Clinical Immunology Laboratory Today. Clin Immunol. Newsletter 1995; 15 (4): 50-54.

Rippey J. Interlaboratory Proficiency Testing in Clinical Laboratory Immunology. Clin. Immunol. Newsletter 1990; 10(3): 31-38.

Sager D. Wernick R., and Davey M. Assays for rheumatoid factor: a review of their utility and limitations in clinical practice. Lab. Med. 1992; 23(1):15-18

Shapiro H. Quantitative immunofluorescence measurements and standards: practical approaches. Clin. Immunol. Newsletter 1991; 11(4):49-54.

Van Veroolij W. Charles P. and Maini R. The consensus workshops for the detection of autoantibodies to intracellular antigens in rheumatic diseases. J. Immunol. Meth 1991; 140:181-189

Teodorescu M. Multiparameter ELISA testing for autoantibodies in rheumatology. Clin. Immunol. Newsletter 1992; 12(4): 49-58.

Zito D. Certification programs in clinical immunology. Clin. Immunol. Newsletter 1994; 14 (10/11): 145-148.

De Rose N. De Macario E. Fahey J. Friedmann H. and Penn G. AM. Soc. Microbiology., Manual of Clinical Laboratory Immunology. 4ª Edition. Washinton.1992.

Capítulo VII

BACTERIOLOGÍA



**Aurora Maldonado Ballesteros, M^a Soledad Prat Miranda,
Cecilia Carmona, Oscar Figueroa Castro,
Alda Fernández Ricci, Sylvia Lagos, Berta Olivares Vicencio,
Wally Silva San Cristóbal, María Eugenia Valenzuela Montero**

CONTROL DE CALIDAD EN BACTERIOLOGÍA

El control de calidad en un laboratorio de Microbiología Clínica comprende el permanente monitoreo de medios de cultivo, reactivos, equipos, procedimientos y personal. Todo esto permite asegurar una correcta ejecución del aislamiento, identificación y caracterización de los microorganismos patógenos presentes en una muestra clínica y realizar pruebas de susceptibilidad a agentes antimicrobianos para guiar la terapia del paciente.

La realización de procedimientos de alta calidad dependen de factores tangibles como por ejemplo, reactivos para una tinción de Gram y de factores intangibles, quizás más importantes, como son las habilidades cognitivas. En este control de calidad es fundamental el personal que analiza en forma crítica sus resultados y aplica estándares escritos lo que permite cuestionar resultados inusuales como por ejemplo patrones de susceptibilidad no vistos anteriormente o aislamientos de microorganismos infrecuentes.

CONTROL DE CALIDAD DE ALGUNOS PROCEDIMIENTOS BACTERIOLÓGICOS

PROCEDIMIENTOS	ACCION	FRECUENCIA	OBSERVACION
1.- Tinción de Gram	-Tinción de bacterias gram (+)	Semanalmente	Realizar la tinción con <i>Staphylococcus aureus</i>
	- Tinción de bacterias gram (-)	Semanalmente	Realizar la tinción con <i>E. coli</i>
2.- Tinciones especiales (ej. esporas, cápsulas, flagelos.)	- Tinción de cepas esporuladas	Semanalmente	Utilizar cepa de <i>Bacillus</i> sp. control positivo.
	- Tinción de cepas capsuladas	Semanalmente	Utilizar cepa de <i>S. pneumoniae</i> como control positivo.
	- Tinción de cepas flageladas	Semanalmente	Utilizar cepa <i>Alcaligenes</i> sp. o <i>Salmonella</i> sp. como control positivo.
3.- Hemocultivo	- Realizar subcultivos y Tinción de gram simultáneamente	Cada vez que se realiza	Si en la tinción de gram se observan bacterias y no se desarrollan en el cultivo se debe pensar en anaerobios o en bacterias fastidiosas.

PROCEDIMIENTOS	ACCION	FRECUENCIA	OBSERVACION																					
	- Revisión de los resultados obtenidos	Mensualmente	Si aparecen con frecuencia <i>Bacillus</i> sp. se debe pensar en contaminación ambiental. Si aparecen con frecuencia <i>Staphylococcus coagulasa</i> negativa debe pensar en contaminación en la toma de muestra.																					
4.- Urocultivo	- Sedimento urinario - Cultivo	Cada vez que se realice	Si se observan abundantes células epiteliales y polimicrobismo, se debe sospechar de una muestra mal tomada y se debe solicitar una nueva muestra. Debe existir concordancia entre sedimento y el cultivo. Un sedimento urinario alterado con cultivo negativo puede deberse a procesamientos de diferentes muestras, si es que estos dos procedimientos se realizan en diferentes laboratorios (por ejemplo, el sedimento en el laboratorio de química y el cultivo en bacteriología). También puede ocurrir si el paciente está en tratamiento antimicrobiano antes de la muestra.																					
5.- Expectoración	- Tinción de Gram - Cultivo	Cada vez que se realice	Clasificar la muestra de se realice expectoración basada en la presencia de leucocitos y células epiteliales. <table border="1"> <thead> <tr> <th>GRUPO</th> <th>LEUCOCITOS</th> <th>CELULAS EPTELIALES</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>6</td> <td>> 25</td> <td>>25</td> </tr> <tr> <td>5</td> <td>> 25</td> <td>>10</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>>25</td> <td>10-25</td> </tr> <tr> <td>3</td> <td>>25</td> <td>>25</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>10-25</td> <td>>25</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td><10</td> <td>>25</td> </tr> </tbody> </table> <p>Se sugiere rechazar el grupo 1, 2 y 3 por ser muestras de mala calidad.</p>	GRUPO	LEUCOCITOS	CELULAS EPTELIALES	6	> 25	>25	5	> 25	>10	4	>25	10-25	3	>25	>25	2	10-25	>25	1	<10	>25
GRUPO	LEUCOCITOS	CELULAS EPTELIALES																						
6	> 25	>25																						
5	> 25	>10																						
4	>25	10-25																						
3	>25	>25																						
2	10-25	>25																						
1	<10	>25																						

CONTROL DE CALIDAD DE MEDIOS DE CULTIVO

Cada partida de medio de cultivo preparado en el laboratorio u obtenido comercialmente, debe ser controlado en el laboratorio para lo cual es necesario realizar:

- **Control de Esterilidad:** Seleccionar al azar, entre un 5 a un 10% de las unidades preparadas, incubar 48 horas a 35° C y luego 48 horas a temperatura ambiente. Si es medio en tubo, escoger muestras del centro del material esterilizado.
- **Control de Propiedades de los Medios de Cultivo:** Las cepas controles a usar, deben ser apropiadas a las características de los medios a controlar que pueden ser:
 - Medios Nutritivos: se observa la capacidad de desarrollo de los microorganismos.
 - Medios Selectivos: estimula el desarrollo de un grupo de bacterias inhibiendo otras.
 - Medios Diferenciales: se observa la respuesta a características bioquímicas.
- **Control de pH:** de acuerdo a las indicaciones del fabricante.
- **Control de Fecha de Expiración:** en general los medios de cultivo conservados en refrigeración duran 14 días, pudiendo mantenerse por períodos de hasta 2 meses en bolsas selladas.

Guía para el Control de Calidad de Medios de Cultivo

A.- Cepas Control:

1.- Selección de cepas control: se recomienda el uso de cepas ATCC, si bien para algunos medios es aceptable usar otras cepas de la misma especie con similares características.

2.- Mantención de cultivos stock:

- Cepa mantenida congelada y/o liofilizada, debe ser propagada por suspensión en leche al 20% y alicuotada (0.5 a 1.0 ml).
- Congelar a -20° C: duración 1 año.
- Congelar a -70° C: duración indefinida.

- Cultivo liofilizado, duración indefinida.
- Realizar el primer traspaso a medio sólido para obtener semilla.
- Controlar viabilidad por lo menos una vez al año.

3.- Propagación de Cultivos Stock para su uso:

- Se recomienda realizar no más de 4 sub-cultivos.
- Para trabajar viales congelados se colocan en agua tibia y se cultiva en medio apropiado.
- No recongelar
- Sembrar en tendidos y placas las que servirán como cultivo primario. Estos pueden ser mantenidos por un período no superior a 4 semanas dependiendo de la bacteria.

4.- Preparación del inóculo: el inóculo varía dependiendo de la capacidad nutritiva o inhibitoria del medio a probar y si las bacterias son más o menos exigentes en sus requerimientos.

- **Bacterias no Fastidiosas:** se utiliza un caldo soya tripticasa con 4 a 5 horas de incubación en fase de crecimiento exponencial. Dejar a una concentración equivalente 0.5 Mac Farland.
- **Bacterias Fastidiosas:** se utiliza un cultivo de 18 a 24 horas de incubación en medio sólido apropiado. Se realiza una suspensión equivalente a 0.5 Mac Farland.
- **Capacidad Nutritiva:** el inóculo standarizado 0.5 Mac Farland (10^7 a 10^8 UFC / ml), se diluye 1/100 con solución salina 0.9%. Las placas son inoculadas con 10 ul., lo que da una concentración final de 10^3 a 10^4 UFC / placa.
- **Capacidad Inhibitoria:** se utiliza una dilución de 1/10 de la suspensión 0,5 Mac Farland de la cual se inoculan 10 ul. obteniéndose una concentración de 10^5 a 10^6 UFC / placa.
- **Medios en tubo:** se inocula 10 ul de la suspensión 0,5 Mac Farland 10^5 a 10^6 UFC / tubo.
- **Medios en profundidad:** medios como TSI, LIA, MIO, OF se recomienda usar asa en punta directo del cultivo original.

B.- Tablas de Referencia:

1.- Medios sólidos:

1.1.- Nutritivos:

MEDIO	CEPA CONTROL	RESULTADO ESPERADO	INCUBACIÓN
Agar Sangre	- <i>Streptococcus grupo A</i> * - <i>Streptococcus pneumoniae</i> *	-Desarrollo -Desarrollo	Aerobiosis 18-24 hrs. 35°C
Agar Chocolate	- <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Streptococcus pneumoniae</i>	-Desarrollo -Desarrollo -Desarrollo	5-10% CO ₂ 24 hrs. 35°C
Agar nutritivo: TSA; Tifica; Conservación de Cepas; Mueller Hinton; Luria; Cerebro corazón; Brucella	- <i>Escherichia coli</i> . - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> * - <i>Candida albicans</i> *	-Desarrollo -Desarrollo -Desarrollo -Desarrollo	Aerobiosis 18-24 hrs 35°C

1.2 Diferenciales -selectivos:

Medio	Cepa control	Resultado esperado	Incubación
Agar Mac Conkey	- <i>Escherichia coli</i> * - <i>Salmonella Typhimurium</i> - <i>Enterococcus faecalis</i>	-Colonias rojas (Lac+) -Colonias incoloras (Lac-)	Aerobiosis 18-24 hrs. 35°C
Agar S-S	- <i>Salmonella Typhimurium</i> - <i>Shigella flexneri</i> - <i>Escherichia coli</i> *	-Col. incolora centro negro (Lac-, H ₂ S +) -Col. incolora (Lac-, H ₂ S -) -Col. roja (Lac+) escaso desarrollo	Aerobiosis 18-24 hrs. 35°C
Agar XLD	- <i>Salmonella Typhimurium</i> - <i>Shigella flexneri</i> - <i>Escherichia coli</i> *	-Colonias rojas centro negro (Xil-, Sac-, Lac-, H ₂ S+) -Colonia roja (Xil-, Sac-, Lac-, H ₂ S-) -Colonia amarilla (Lac+, H ₂ S-)	Aerobiosis 18-24 hrs. 35°C
Agar Bismuto Sulfito	- <i>Salmonella Typhi</i> - <i>Salmonella Typhimurium</i> - <i>Escherichia coli</i> *	-Colonia negra con halo café -Colonia negra brillo metálico -Colonia verde	Aerobiosis 48 hrs. 35°C
Agar TCBS	- <i>Vibrio cholerae</i> - <i>Vibrio parahaemolyticus</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Colonia amarilla (Sacarosa +) -Colonia verde (Sacarosa -) -Sin desarrollo	Aerobiosis 18 - 24 hrs. 35°C

Medio	Cepa control	Resultado esperado	Incubación
Agar sangre telurito	- <i>Corynebacterium diphtheriae</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Desarrollo colonias negras -Sin desarrollo	Aerobiosis 18-24 hrs. 35°C
Agar Mac Conkey - Sorbitol	- <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Escherichia coli</i> - <i>Proteus mirabilis</i>	-Sin desarrollo -Col.roja (Sorbitol +) -Incoloro (Sorbitol -)	Aerobiosis 18-24 hrs. 35°C
Agar Manitol Sal	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Col. amarilla (Manita +) -Col.roja (Manita -) -Sin desarrollo	Aerobiosis 72 hrs. 35°C

1.3.- Medios Selectivos:

MEDIO	CEPA CONTROL	RESULTADO ESPERADO	INCUBACIÓN
Agar Thayer Martin	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Desarrollo -Sin Desarrollo -Sin Desarrollo	5-10% CO ₂ 24-48 hrs. 35°C
Medio Selectivo para <i>Campylobacter</i>	- <i>Campylobacter jejuni</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Desarrollo -Sin Desarrollo -Sin Desarrollo	Microaerofilia 5-10% CO ₂ 10% H ₂ y 80% N 48 hrs. / 35°C
Medio Selectivo para <i>Bordetella</i>	- <i>Bordetella pertussis</i> - <i>Staphylococcus aureus</i>	-Desarroll -Sin Desarrollo	Aerobiosis; Cámara húmeda 7 días / 35°C
Medio Selectivo para <i>Legionella</i> BCYE	- <i>Legionella pneumophila</i> - <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Desarrollo -Sin Desarrollo -Sin Desarrollo	CO ₂ 5-10%; Cámara húmeda 7-14 días 35°C
Medio Selectivo para <i>Mycoplasma pneumoniae</i> SP4	- <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	-Desarrollo	Aerobiosis o Microaerofilia Hasta 30 días 35°C
Medio difásico para <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	- <i>Mycoplasma pneumoniae</i>	Cambio de pH +: verde manzana -: verde botella o café	Aerobiosis Hasta 30 días 35°C
Medio Selectivo para <i>Mycoplasma hominis</i> <i>Ureaplasma urealyticum</i> A7	- <i>Mycoplasma hominis</i> - <i>Ureaplasma urealyticum</i> observar al	Desarrollo de colonias al 35°C microscopio	Aerobiosis o Microaerofilia 3-5 días

1.4.- Medios de Transporte: Incubación en Aerobiosis a 35° C.

MEDIO	CEPA CONTROL	RESULTADO ESPERADO
Stuart	- <i>Corynebacterium diphtheriae</i> - <i>Haemophilus influenzae</i> - <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Shigella flexneri</i> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> *	Desarrollo entre las 24 a 48 hrs. en subcultivo.
Amies (con carbon)	- <i>Neisseria gonorrhoeae</i> - <i>Shigella flexneri</i> - <i>Streptococcus pneumoniae</i> *	Desarrollo entre las 24 a 48 hrs. en subcultivo.
Amies (sin carbon)	- <i>Haemophilus influenzae</i>	Desarrollo entre las 24 A 48 hrs. en subcultivo
Cary - Blair	- <i>Shigella flexneri</i> - <i>Campylobacter</i> sp.	- Desarrollo entre las 18 a 24 hrs. - Desarrollo a las 48 hrs. en subcultivos

* Cepa ATCC

1.5.- Medios Diferenciales: Incubación en Aerobiosis. 18-24 hrs. a 35°C.

MEDIO	CEPAS CONTROL	REACCIÓN ESPERADA
King A	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Pigmento verde -Sin pigmento
King B	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - - <i>Escherichia coli</i>	-Pigmento fluorescente con Luz Ultra Violeta -Sin pigmento fluorescente
Agar sangre blando	- <i>Streptococcus pyogenes</i> * - <i>Streptococcus pneumoniae</i> *	-βHemólisis -αHemólisis
TSI	- <i>Escherichia coli</i>	-Tendido: acidifica (amarillo) -Columna: acidifica (amarillo) -Gas: positivo (ruptura del agar) -H ₂ S: negativo
	- <i>Proteus vulgaris</i>	-Tendido: acidifica (amarillo) -Columna: acidifica (amarillo) -Gas: positivo (ruptura del agar) -H ₂ S: positivo (ennegrecimiento del agar)

MEDIO	CEPAS CONTROL	REACCIÓN ESPERADA
	<i>Shigella flexneri</i>	-Tendido: alcaliniza (rojo) Columna: acidifica (amarillo) Gas: negativo H ₂ S: negativo
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Tendido: alcaliniza (rojo) Columna: alcaliniza (rojo) Gas: negativo H ₂ S: negativo
LIA	<i>Escherichia coli</i>	-Columna: púrpura (decarboxilación de la lisina positiva) Gas: positivo (ruptura del agar) H ₂ S: negativo
	<i>Proteus vulgaris</i>	-Columna: amarilla Tendido: rojo (deaminación de la lisina positiva) Gas: positivo (ruptura del agar) H ₂ S: positivo (ennegrecimiento del agar)
	<i>Shigella flexneri</i>	-Columna: amarilla (decarboxilación lisina negativa) Gas: negativo H ₂ S: negativo
MIO	<i>Escherichia coli</i>	Movilidad: positiva (columna turbia) Indol: positivo (anillo rojo, superficie) Ornitina: positiva (columna púrpura)
	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Movilidad: negativa (desarrollo en la picada) Indol: negativo (anillo amarillo, superficie) Ornitina: negativa (columna amarilla)
Urea de Christensen	<i>Proteus vulgaris</i> <i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	Columna y tendido: rojo -Tendido: rojo -No vira
Citrato de Simmons	<i>Klebsiella pneumoniae</i> <i>Escherichia coli</i>	-Vira a azul -No vira
O F (Hugh Leifson)	<i>Escherichia coli</i> <i>Acinetobacter baumannii</i>	-Aerobiosis: columna amarilla (oxidación +) Anaerobiosis: columna amarilla (fermentación +) -Aerobiosis: columna amarilla (oxidación +) Anaerobiosis: no vira (fermentación -)
Movilidad Nitrato	<i>Escherichia coli</i> <i>Acinetobacter sp.</i>	-Columna: enturbiamiento (movilidad +) Anillo superficie: rojo (nitrato +) -Columna: desarrollo en la picada Anillo superficie: no vira
Bilis Esculina	<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Streptococcus grupo viridans</i>	-ennegrecimiento del medio -no vira
Gelatina (Bouvet) (reactivo de Frazier)	<i>Pseudomonas fluorescens</i> <i>Escherichia coli</i>	- reacción positiva: halo alrededor de la colonia - reacción negativa: sin halo

* Cepa ATCC

MEDIO	CEPAS CONTROL	REACCIÓN ESPERADA
Medio H ₂ S	- <i>Proteus vulgaris</i> - <i>Escherichia coli</i>	-ennegrecimiento del medio -No vira
CTA (con azúcares)	- <i>Enterobacter aerogenes</i> - <i>Branhamella catarrhalis</i>	-Columna: amarillo (reacción positiva) -No vira
DNA sa (indicador azul de toluidina)	- <i>Serratia</i> sp. - <i>Escherichia coli</i>	-Halo rosado alrededor de la colonia (reacción positiva) -No vira
GI Movilidad	- <i>Salmonella</i> Typhimurium - <i>Shigella</i> sp.	-Columna: enturbiamiento (movilidad positiva) -Columna: desarrollo en la picada (movilidad negativa)
Agar Esculina	- <i>Aeromonas hydrophila</i> - <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	-Reacción positiva: café oscuro -Reacción negativa: no vira
FLN	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Acinetobacter baumannii</i>	-Fluorescencia: positiva con Luz Ultra Violeta Oxidación Lactosa: negativa (no vira) Denitrificación: positiva (burbujas de gas) -Fluorescencia: negativa Oxidación Lactosa: positiva (tendido amarillo) Denitrificación: negativa

2.- Medios en Caldo:

2.1.- Caldos nutritivos:

MEDIO	CEPAS CONTROL	REACCIÓN ESPERADA	INCUBACIÓN
Caldo Hemocultivo Aerobio (Infuso Cerebro Corazón, Caldo Brucella, Caldo Columbia, Caldo Soya Trypticasa)	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> * - <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Candida albicans</i>	-Desarrollo -Desarrollo -Desarrollo	18 a 24 hrs. a 35° C
Caldo Nutritivo (Mueller Hinton, Peptonado, Soya Trypticasa, Triptosa Fosfato)	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Desarrollo -Desarrollo	18 a 24 hrs. a 35° C
Caldo Todd Hewitt (para <i>Streptococcus</i>)	- <i>Streptococcus pyogenes</i> * - <i>Streptococcus pneumoniae</i> *	-Desarrollo -Desarrollo	18 a 24 hrs. a 35° C

* Cepa ATCC

2.2.- Caldos Diferenciales:

MEDIO	CEPA CONTROL	REACCIÓN ESPERADA	INCUBACION
Caldo Base Fermentación Azúcares (Arabinosa 10%)	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Enterococcus faecalis</i>	- Acidifica - No vira	18-24 hrs. a 35° C
Decarboxilasa Base Moeller (Lisina - Arginina - Ornitina)	- <i>Salmonella Typhimurium</i> - <i>Proteus Vulgaris</i>	-Decarboxilación positiva de: Lisina: color púrpura Arginina: color púrpura Ornitina: color púrpura -Decarboxilación negativa de: Lisina: color amarillo Arginina: color amarillo Ornitina: color amarillo	Hasta 4 días a 35° C (en anaerobiosis relativa)
Caldo Malonato de Sodio	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Reacción positiva: color azul -Reacción negativa: no vira	18-24 hrs. a 35° C
Caldo NaCl 6,5% (con glucosa e indicador púrpura bromocresol)	- <i>Enterococcus faecalis</i> - <i>Streptococcus grupo vitridans</i>	-Desarrollo y vira a amarillo - Sin desarrollo	18-24 hrs. a 35° C
Caldo Urea (con fenolftaleína)	- <i>Proteus vulgaris</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Reacción positiva: color rojo -Reacción negativa: no vira	18-24 hrs. a 35° C
Caldo Nitrato	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Acinetobacter sp.</i>	-Reacción positiva: anillo rojo -Reacción negativa: no vira	8-24 hrs. a 35° C

2.3.- Caldos de Enriquecimiento:

MEDIO	CEPA CONTROL	REACCIÓN ESPERADA	INCUBACION
Agua Peptonada Alcalina	- <i>Vibrio cholerae</i> no O1 - <i>Escherichia coli</i>	-Desarrollo en el subcultivo -Inhibición parcial en subcultivo	4-6 hrs. a 35° C
Caldo Selenito F	- <i>Salmonella Typhimurium</i> - <i>Shigella sonnei</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Desarrollo en subcultivo -Inhibición parcial en subcultivo -Inhibición parcial en subcultivo	12 hrs. a 35° C

3.- Otras Pruebas:

PRUEBA	CEPA CONTROL	RESULTADO ESPERADO
Oxidasa	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Reacción positiva: color azul violeta -Reacción negativa: no vira
Catalasa	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Streptococcus sp.</i>	-Reacción positiva: producción de burbujas -Reacción negativa: sin burbujas
Coagulasa	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-Reacción positiva: formación de coagulo -Reacción negativa: sin cambio
Novobiocina	- <i>Staphylococcus saprophyticus</i> * - <i>Staphylococcus epidermidis</i>	-Resistente: zona inhibición < ó = a 15mm. -Sensible: zona inhibición > ó = a 16 mm.
Optoquina	- <i>Streptococcus pneumoniae</i> * - <i>Streptococcus grupo viridans</i>	-Zona de inhibición > ó = 14 mm. (de acuerdo al fabricante) -Sin inhibición
Bacitracina	- <i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A) - <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)	-Inhibe crecimiento -Sin zona de inhibición
ONPG	- <i>Citrobacter freundii</i> - <i>Salmonella Typhimurium</i>	-Reacción positiva: color amarillo -Reacción negativa: no vira
Hipurato de Sodio (con Fe Cl ₃)	- <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B)* - <i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)*	-Reacción positiva: precipitado amarillo anaranjado en 10 minutos -Reacción negativa: Sin precipitado
Rojo Metilo	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-Reacción positiva: color rojo -Reacción negativa: color anaranjado
Voges-Proskauer	- <i>Klebsiella pneumoniae</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Reacción positiva: color rojo -Reacción negativa: no vira
Reacción Indol	- <i>Escherichia coli</i> - <i>Klebsiella pneumoniae</i>	-Reacción positiva: anillo rojo -Reacción negativa: anillo incoloro
Deaminación de Fenilalanina (Fe Cl ₃)	- <i>Proteus sp.</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Reacción positiva: color verde -Reacción negativa: no vira
β Lactamasa	- <i>Staphylococcus aureus</i> * - <i>Haemophilus influenzae</i> *	-Reacción positiva: cambio de color -Reacción negativa: no vira
Factores X - V	- <i>Haemophilus influenzae</i> *	-Crecimiento alrededor de los discos
Porfirina	- <i>Haemophilus parainfluenzae</i> - <i>Haemophilus influenzae</i>	-Reacción positiva: color rosado fluorescente -Reacción negativa: sin fluorescencia
Test de Camp	- <i>Streptococcus agalactiae</i> (grupo B) - <i>Streptococcus pyogenes</i> (grupo A)	-Reacción positiva: hemólisis en punta de flecha -Reacción negativa: hemólisis sin punta de flecha
Tinción de gram	- <i>Staphylococcus aureus</i> - <i>Escherichia coli</i>	-Coloración violeta -Coloración rosada

* Cepa ATCC

4.- Control de Calidad para Bacterias Anaerobias:

4.1.- Medios de Cultivo:

MEDIO	CEPA CONTROL	RESULTADO ESPERADO	INCUBACIÓN
Agar sangre para Anaerobio	- <i>Bacteroides fragilis</i> * - <i>Clostridium perfringens</i> *	-Desarrollo -Desarrollo con β hemólisis	Atmósfera anaeróbica 24-48 hrs. a 35° C
Egg Yolk agar (E Y A)	- <i>Clostridium perfringens</i> * - <i>Fusobacterium necrophorum</i> - <i>Bacteroides fragilis</i>	-Reacción de lecitinasa positiva, halo amarillo limón opaco alrededor de la colonia. -Reacción de lecitinasa positiva halo iridiscente alrededor de la colonia. -Lecitinasa y lipasa negativa	Atmósfera anaeróbica 24-48 hrs. a 35° C
Agar CCFA	- <i>Clostridium difficile</i> - <i>Bacteroides fragilis</i> * - <i>Escherichia coli</i> *	-Desarrollo -Sin desarrollo por cefoxitin -Sin desarrollo por cicloserina	Atmósfera anaeróbica 24-48 hrs. a 35° C
Tioglicolato de Sodio (enriquecido)	- <i>Bacteroides vulgatus</i> *	-Desarrollo	Atmósfera anaeróbica 48 hrs. a 35° C
Frascos de Hemocultivos	- <i>Bacteroides fragilis</i> - <i>Haemophilus influenzae</i>	-Desarrollo -Desarrollo	Atmósfera anaeróbica 24-48 hrs. a 35° C
Caldo Esculina	- <i>Bacteroides fragilis</i>	-Reacción positiva: café negrusco	Atmósfera anaeróbica 48-72 hrs. a 35° C
Indol - Nitrato	- <i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> - <i>Bacteroides fragilis</i>	Indol: -Reacción positiva: anillo rojo -Reacción negativa: anillo amarillo	Atmósfera anaeróbica 48 hrs. a 35° C
Bilis al 20%	- <i>Bacteroides fragilis</i> - <i>Fusobacterium nucleatum</i>	-Desarrollo estimulado -Inhibición	Atmósfera anaeróbica 48 hrs. a 35° C

* Cepa ATCC

4.2.- Otras Pruebas: Incubación en Atmósfera Anaerobia, 48 hrs. a 35° C.

PRUEBA	CEPA CONTROL	REACCIÓN ESPERADA
Disco de Colistin 10 ug.	- <i>Fusobacterium necrophorum</i> - <i>Bacteroides fragilis</i>	-Sensible -Resistente
Disco de Kanamicina 1 ug.	- <i>Clostridium perfringens</i> *	-Sensible
Disco de Vancomicina 5 ug.	- <i>Clostridium perfringens</i> *	-Sensible
Disco de Nitrato	- <i>Propionibacterium acnes</i> - <i>Bacteroides fragilis</i>	-Reacción positiva: color rojo con reactivos A (alfa-naftil amina) y B (ácido sulfanílico). Incoloro con polvos de Zinc. -Reacción negativa: incoloro con reactivos A y B. Rojo con polvos de Zinc.

PRUEBA	CEPA CONTROL	RESULTADO ESPERADO	INCUBACION
Discos de Polianetolsulfonato de sodio (S P S)	- <i>Peptostreptococcus anaerobius</i>	-Sensible: halo > 12 mm. de inhibición -Resistente: < 12 mm.	Atmósfera anaeróbica 48 hrs.a 35° C
Disco de H. Esculina	- <i>Bacteroides fragilis</i> *	-Reacción positiva: color café negrusco -Reacción negativa: incoloro	
Disco de Urea	- <i>Bacteroides ureolyticum</i> - <i>Bacteroides fragilis</i> *	-Reacción positiva: rojo púpura en todo el disco -Reacción negativa: amarillo o punto rojo	
Catalasa al 30%	- <i>Bacteroides fragilis</i> * - <i>Clostridium perfringens</i>	-Reacción positiva: producción de burbujas -Reacción negativa: sin burbujas	Atmósfera anaeróbica 48 hrs.a 35° C. Hacer reacción 1 hora después de abrir jarra anaeróbica.

5.-Listado de Cepas ATCC:

- * *Staphylococcus aureus* 25923
- * *Haemophilus influenzae* 10211
- * *Streptococcus pneumoniae* 49619
- * *Streptococcus pyogenes* 19615
- * *Streptococcus agalactiae* 13813

- * *Escherichia coli* 25922
- * *Bacteroides fragilis* 25285
- * *Clostridium perfringens* 13124
- * *Bacteroides vulgatus* 8482
- * *Candida albicans* 18804

FICHA CONTROL DE MEDIOS DE CULTIVO

NOMBRE DEL MEDIO DE CULTIVO

CEPA 1
CEPA 2
CEPA 3

FECHA CONTROL	LOTE DE FABRICACION	FECHA VENCIMIENTO	pH	PRUEBA					CONTROL ESTERILIDAD		OBSERV.	INTERPRETADO POR
				1	2	3	4	5	48 horas	96 horas		

OBSERVACIONES:

Incluir características, volumen adecuado del medio en tubo o placa, superficie del agar (si es lisa), color, si es sangre observar si está hemolizada, si hay contaminación, si está el material quebrado, etc.

FICHA DE CONTROL DE CALIDAD DE REACTIVOS

NOMBRE DE LA PRUEBA O REACTIVO:

CEPA CONTROL POSITIVO:
CEPA CONTROL NEGATIVO:
PERIODICIDAD:

FECHA	FECHA DE EXP. REACTIVO	FECHA DE DESCONGELADO	FECHA DE PREPARACION	REACCIONES		INTERPRETADO POR
				+	-	

Maxima duración de medios de cultivo

6.1.- Placas con medios de cultivo:

MEDIO	REFRIGERADOR 4°C SIN BOLSA PLÁSTICA	REFRIGERADOR 4°C CON BOLSA PLÁSTICA
Agar Sangre	15 días	50 días
Agar Chocolate	15 días	60 días
Agar Mac Conkey	15 días	70 días
Agar Sabouraud	21 días	90 días
Agar Menta Sal	21 días	60 días
Agar SPS	15 días	10 días

6.2.- Caldos de cultivo:

Medio	Tapón no hermético 4°C Nº de semanas	Tapón no hermético Temperatura Ambiente Nº de semanas	Tapón hermético bolsa plástica Temperatura Ambiente Nº de meses	Sello de seguridad Temperatura Ambiente Nº de meses
Agar Triptic	34	11	24	36
Agar Lysine Desferal	34	11	24	36
Agar Lysine Desferal	34	11	24	36
Agar Lysine Desferal	34	11	24	36
Agar Lysine Desferal	34	11	24	36
Agar Lysine Desferal	34	11	24	36
Agar Lysine Desferal	34	11	24	36

6.3.- Tubos con Agar:

Medio	Tapón no hermético	Tapón no hermético	Tapón hermético bolsa plástica	Sello de seguridad
	4° C N° de semanas	Temperatura ambiente N° de semanas	Temperatura ambiente N° de meses	Temperatura ambiente N° de meses
Agar Tendido	34	1-2	24	36
Agar Bilis Esculina	34	1-2	24	36
Agar Fenilalanina	34	1-2	24	36
Agar LIA3-4	1-2	24	36	
Agar TSI3-4	1-2	24	36	
Agar MIO	34	1	24	36
Agar Mueller Hinton 3-4	1-2	24	36	
Agar Nutritivo	34	1-2	24	36
Agar O-F	34	1-2	24	36
Agar Urea de Christensen	34	1-2	24	36

CONTROL DE CALIDAD EN PRUEBAS DE SENSIBILIDAD

La técnica más simple, de menor costo y de más fácil ejecución para determinar la sensibilidad bacteriana frente a los antibióticos es el método de difusión en agar. El método descrito por Kirby - Bauer en 1966 es el aceptado y recomendado por el National Committee for Clinical Laboratory Standards (N.C.C.L.S.).

En la ejecución de esta técnica intervienen diversas variables que si no son debidamente controladas afectan adversamente la exactitud y reproducibilidad de los resultados obtenidos.

La tabla siguiente destaca las principales variables a controlar:

VARIABLE	CONTROLAR	REQUISITOS	CONSECUENCIAS
Almacenamiento	-sensidiscos -placas con agar -standard de turbidez	- -18 a -22 ° C ^a - 2 a 8 ° C ^b - 1 ^o ambiente en oscuridad	-Inactivación de las drogas -Alteración del agar - Alteración en la turbidez del inóculo
Acidez	pH	7.2-7.4	Inactivación de las drogas
Esterilidad	placas y caldos	Incubar 48 hrs a 35° C	Contaminación, repeticiones
Lectura	-profundidad del agar -densidad del inóculo	tener experiencia, leer con precisión, con tablas de referencia -0,5 Mac Farland (10 ⁷ a 10 ⁸ UFC / ml.)	Lectura e interpretación errónea de los resultados

a: Se puede mantener entre 2 a 8 ° C la cantidad de sensidiscos necesaria para el trabajo semanal, con la excepción de **Penicilinas** y **Cefalosporinas** las que deben mantenerse siempre a **-20° C**.

b: Las placas se pueden mantener hasta 5 días a estas temperaturas, sin embargo se recomienda usarlas dentro de las 48 hrs. después de preparadas.

El uso de rutina de cepas ATCC para realizar el control de calidad de la técnica de sensibilidad permite controlar los diferentes lotes de sensidiscos y del medio de cultivo utilizado. Además el trabajar simultáneamente estas cepas con las de la muestra en estudio permite llevar un control de todo el procedimiento al ser de rangos de sensibilidad conocidos. De esta forma se puede realizar un adecuado Control de Calidad abarcando todas las fuentes de error.

Las recomendaciones del NCCLS en relación a las cepas control se describen en la siguiente tabla:

CEPA	USO RECOMENDADO	OBSERVACIONES
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Control de sensidiscos de bacterias gram negativas	cepa β lactamasa negativa ^a
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	Control de sensidiscos de	cepa β lactamasa negativa ^a
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853 ^b	Control de Aminoglicósidos	Tambien podrian usarse en pruebas adicionales con otras drogas con rango de sensibilidad conocido.
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	Control de Sulfametoxazol-trimetoprim	Valorar la concentración de inhibidores de timina y timidina en los lotes de agar.
<i>Escherichia coli</i> ATCC 35218	Inhibidores de β lactamasa unidos a β lactámicos (Ampicilina/Sulbactam, Amoxicilina/Ac. clavulánico)	cepa β lactamasa positiva. Resistente al componente β lactámico solo.
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 4924	Control de sensidiscos para <i>Haemophilus</i> sp.	Usar Haemophilus Test Medium ^c (HTM).
<i>Haemophilus influenzae</i> ATCC 49766	Cefalosporinas seleccionadas.	Usar Haemophilus Test Medium ^c (HTM).
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> ATCC 49226	Control de sensidiscos para <i>Neisseria</i> sp.	Usar agar base GC con Cisteína.
<i>Streptococcus pneumoniae</i> ATCC 49619	Control de sensidiscos para <i>Streptococcus pneumoniae</i>	Usar agar Mueller Hinton con sangre de cordero al 5%.

a: otras drogas activas frente a esta cepa.

b: esta cepa puede mutar y adquirir resistencia a Penicilinas activas para el genero *Pseudomonas*.

c: *H. influenzae* ATCC 10211 se usa para el control de crecimiento en el medio HTM y cuando se desencadena un problema relacionado a bajo crecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

Henry D. Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook.

Vol 1 Y 2. Washington DC: American Society For Microbiology, 1992.

M.L. Castillo de Sanchez, M.E. Fonseca Yerena. Mejoría Continua de la Calidad. Mexico, D.F. Editorial Medica Panamericana, 1995.

James A. Talbot, Marguerite Loevgren, Jean Weekes. En Dr. Jose Luis Di Fabio. Laboratory Quality Management and Haemophilus Identificatiion and Susceptibility Testing. Monvideo: Sireva Project Workshop Series, 1996.

David L. Sewell and Ron B. Schigman. Quality Assurance: Quality Improvement, Quality Control, and Validation. En: Murray, Manual of Clinical Microbiology. Vol 5. Washington, DC, 1995; 55-66.

National Committee for Clinical Laboratory Standards. 1991 Quality Assurance for Commercially Prepared Microbiological Culture Media. Vol 10, Nº 14. Approved Standard M22A. NCCLS, Villanova, PA.

National Committe for Clinical Laboratory Standards. Vol 15, Nº 14. 1995

Henry D. Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington,DC, American Society for Microbiology, Vol 1-2, 1992

Capítulo VIII

MICOBACTERIAS

Pedro Valenzuela Hiriart, Rosario Lepe Lepe

CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN TUBERCULOSIS

Las técnicas bacteriológicas en tuberculosis son importantes tanto en el diagnóstico de la enfermedad, como en el control de la eficacia del tratamiento. Por esta razón la mantención de un programa de control de calidad interno es determinante para lograr una calidad que de garantía a los resultados logrados.

Muestras: Las características propias de la micobacteriología hace que se establezcan requisitos especiales para las muestras en que se requiere investigación de tuberculosis.

1.- Las orinas y los contenidos gástricos deben trabajarse lo más próximos al momento de su obtención ya que el pH ácido generalmente daña la viabilidad del bacilo (no más de 12 hrs).

2.- Las secciones broncoaspiradas o los lavados broncoalveolares deben procesarse de inmediato después de su obtención ya que el contacto con los anestésicos usados en la extracción desfasan los tiempos de desarrollo habitual, pudiendo en ocasiones no detectarse presencia de bacilos aunque existan (no más de 12 hrs.)

Procedimientos	Acción	Control de calidad	Frecuencia
I-Zielh - Neelsen -Ex. directo -Baciloscopia	1.- Observación microscópica de un lote de 10 baciloscopías.	Permite analizar: - Calidad de las muestras - Tipo de extendido - Fijación - Tinción - Preparación y conservación	Semanal
	2.- Observación del Proceso	Permite analizar: - Calidad de las muestras - Elección de la partícula útil - Extendido - Fijación - Tinción - emisión de vapores - Tiempos de tinción y decoloración	Quincenal
	3.- Observación de lectura microscópica	- Recuento de BAAR por campo - Lectura de zonas representativas - N° de campos observados	Quincenal
	4.- Verificar conservación de baciloscopías rutina (PEEC)	- Limpieza de láminas - Identificación clara - Guardado individual	Mensual

Procedimientos	Acción	Control de calidad	Frecuencia
II- CULTIVO	1- Observación de cultivo a las 72 hrs.	Permite: - Detectar el pH de siembra - Contaminación precoz - Cantidad de siembra - N° de tubos de siembra	Semanal
	2- Observación crítica de los cultivos al leerlos a los 30 y 60 días	Permite: - Detección de contaminación por tubo y por muestra - Variaciones de pH - Concordancia con la baciloscopia - Calcular% de cultivos contaminados	Al tiempo de lectura Mensualmente
	3- Observación directa del proceso completo	Permite: - Observar cerrado - Centrifugación r.p.m y tiempo - Proporción muestra de contaminante - Tiempo agitación - Series máximas de 12 muestras - Neutralización inmediata - Ajuste de pH antes de sembrar - N° tubos a sembrar por tipo de muestra - Incubación previa (N° días) - Sellado definitivo	Quincenal
	4- Observación de lectura de cultivo y derivación de cepas	- Aplicación de pauta de lectura - Normas vigentes de	
	5- Firma de informe	- Verificar nombre y apellidos - Procedencia - Resultado e informe	Diario
III- Medio de cultivo (Loewenstein Jensen)	1- Verificar condiciones del material a usar	- Condiciones ambientales - Esterilidad de todo el material - Desinfección y neutralización de juguera - Observación de transparencia de sales estériles	Mensual Cada vez que se prepare

Procedimientos	Acción	Control de calidad	Frecuencia
	2-. Observar la preparación de medio	<ul style="list-style-type: none"> - Verificar frescura de los huevos - Trabajo en condiciones asépticas - Estabilidad del medio - Repartición del medio y cantidad por tubo 	Mensual
	3-. Observación del proceso de coagulación	<ul style="list-style-type: none"> - Tender los medios sin ensuciar ni mojar tapón - Verificar funcionamiento del ventilador del coagulador - Coagulación precisa en el tiempo y temperatura establecida (80-83°C por 50-60 min) 	Mensual
	4-. Control final	<ul style="list-style-type: none"> - De esterilidad - Conservación - Duración 	
IV- Determinación de adenosindeaminasa (ADA)	1-. En relación a las muestras verificadas	<ul style="list-style-type: none"> - Que toda muestra con coagulo o reticulo se centrifuga -No trabajar muestras hemolizadas 	Mensual
	2-. Verificar los requisitos para los reactivos	<ul style="list-style-type: none"> - Confirmar que todos los reactivos tengan registro de preparación - Que todos los reactivos estén preparados con agua bidestilada o hervida por 10 min. mínimo 	Cada vez que se prepare el buffer
	3-.Hacer curva de calibración	<ul style="list-style-type: none"> - Cada vez que se renueva el buffer - Cada vez que se renuevan todos los reactivos 	
	4-. Chequear durante el desarrollo técnico	<ul style="list-style-type: none"> - Determinar pH cada vez que se prepara adenosina - Trabajar en duplicado cada muestra y promediar las lecturas (D.O.) 	Mensual
	5-. Verificar el envío de resultados	<ul style="list-style-type: none"> - Que sea de inmediato 	Diario

BIBLIOGRAFÍA

Guía para el diagnóstico de la tuberculosis por el examen microscópico. Publicación científica N° 277 OPS/OMS Washington, DC, 1974

Manual de Bacteriología de la Tuberculosis. Técnica y procedimientos básicos. Washington, DC: OPS, 1973

Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la Bacteriología de la Tuberculosis. La muestra. El examen microscópico. Centro Panamericano de Zoonosis. Nota técnica N° 26, 1984

Manual de Normas y Procedimientos Técnicos para la bacteriología de la Tuberculosis: El cultivo del *M. tuberculosis*. Centro Panamericano de Zoonosis Nota técnica N° 27, 1985.

Henry D. Isenberg. Clinical Microbiology Procedures Handbook. Washington, DC, American Society for Microbiology, Vol 1-2, 1992

Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina, Ed. Español: ML Castillo, ME Fonseca, en colaboración con COLABIOCLI. Editorial Médica Panamericana, 1995.

Capítulo IX

VIROLOGÍA

**Judith Mora Riquelme, Eugenio Ramírez Villalobos,
Lilian Vera Donoso, Graciela Torres Iriarte**

CONTROL DE CALIDAD DE VIROLOGÍA EN LABORATORIOS CLÍNICOS Y BANCOS DE SANGRE QUE REALIZAN DETERMINACIONES DE:

I VIRUS DE LA HEPATITIS Y VIH / SIDA II VIRUS RESPIRATORIOS

I. Virus de la Hepatitis y VIH / SIDA

La información que obtienen los laboratorios, puede ser crucial no sólo para los pacientes individuales sino para el monitoreo general de la salud pública y para la vigilancia epidemiológica, la evaluación de la efectividad de la prevención de enfermedades y el curso de las campañas de control.

Infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH)

El diagnóstico de la infección por VIH se realiza habitualmente a través de la determinación de anticuerpos específicos antivirales.

Selección de una prueba para tamizaje:

Es necesario que las pruebas de tamizaje tengan un 100% de sensibilidad y por lo menos un 95% de especificidad. En general los métodos poseen una buena sensibilidad y sus resultados son reproducibles aunque no están libres de resultados falsos positivos.

Es importante considerar el valor predictivo de un resultado. Este valor depende de la población estudiada y de las características del ensayo utilizado. En poblaciones de baja prevalencia los valores predictivos positivos son siempre reducidos.

En la selección de las pruebas y equipos comerciales es necesario considerar:

- a. Grado de complejidad o nivel tecnológico del laboratorio y el volumen de muestras que se procesan.
- b. Capacidad para la conservación apropiada de los equipos comerciales.
- c. En los bancos de sangre es primordial considerar el uso de equipos de alta sensibilidad.
- d. En situaciones de diagnóstico los equipos comerciales elegidos deben tener un alto valor predictivo.
- e. Trabajar con una técnica evaluada por el ISP. Esta técnica debe cumplir los siguientes

- tes requisitos: 100% de sensibilidad, >95% de especificidad.
- f. Disponibilidad constante de reactivos y adecuada asesoría técnica del proveedor.

Algoritmo diagnóstico en laboratorios y Bancos de Sangre

A objeto de evitar diagnósticos erróneos por confusión de muestras durante el proceso de pesquisa y confirmación serológica de VIH/SIDA, el Centro Nacional de Referencia del SIDA (CNRS) del ISP recomienda el siguiente algoritmo de trabajo en el laboratorio o banco de sangre:

1. Toda muestra reactiva debe repetirse una segunda vez con la misma prueba de tamizaje. Los sueros doblemente reactivos deben ser enviados al ISP donde serán analizados con pruebas suplementarias de confirmación.
2. En toda situación en la cual el CNRS confirme una muestra como positiva para VIH, el laboratorio local antes de entregar esta información al clínico responsable o paciente, deberá proceder a tomar una segunda muestra de sangre y repetir localmente el examen de tamizaje originalmente efectuado. Solamente si esta segunda prueba es positiva, sin necesidad de nueva confirmación, se procederá a informar al médico tratante y efectuar la notificación correspondiente al Servicio de Salud.

Uso de material control

- a) Preparar sueros de control para VIH, confirmados por un Centro de Referencia:
- 1.- No reactivo
 - 2.- Reactivo alto
 - 3.- Reactivo débil

En un volumen adecuado para realizar mediciones repetidas durante 2 a 3 meses como mínimo. Estos deben ser centrifugados y/o filtrados, alicuotados en volúmenes de 250 a 500 μ l y conservados en refrigeración o congelación.

Se debe evitar el congelar y descongelar las muestras por más de dos veces ya que este procedimiento daña el material de control.

- b) En el caso de técnicas de ELISA con lectura espectrofotométrica:

Construcción de cartas control: Calcular la Media (M) y Desviación Estándar (DS) de los sueros control. Realizar 20 determinaciones como mínimo y calcular la M y DS. Con estos valores se podrá establecer una curva control en un gráfico con un valor límite superior, $M + 2DS$ y otro inferior $M - 2DS$ (Se adjunta carta de Curva de Control de

suero Standard Reactivo a VIH). Al registrar los resultados diarios del suero control es posible observar en forma sencilla y rápida cuando se producen irregularidades.

c) Realizar diluciones del control positivo hasta la dilución reactiva límite CADA VEZ QUE SE ABRA UN NUEVO LOTE o ENVASE DE REACTIVOS, en caso que no detecte la dilución anterior a la reactiva límite preestablecida comunicarlo al proveedor y revisar el método empleado.

II VIRUS RESPIRATORIOS

Recomendaciones para Técnica de Inmunofluorescencia Indirecta (IFI):

1. Cada vez que se realice la técnica deben usarse controles positivos y negativos.
2. Usar un microscopio con lámpara de mercurio. No se recomienda el uso de microscopio con lámpara halógena (entrega resultados falsos negativos).
3. En caso de detectar frotis con lectura insuficiente, se debe repetir el procedimiento utilizando la contramuestra. Si persiste el problema solicitar nueva muestra.

CONTROL DE CALIDAD PARA LOS LABORATORIOS DE SEROLOGÍA DE LOS BANCOS DE SANGRE

La transmisión de enfermedades infecciosas por medio de transfusión de sangre y hemocomponentes es de creciente importancia no sólo en el ámbito de quienes se desempeñan en la medicina transfusional, sino también para quienes están comprometidos con la salud de la comunidad. Por lo tanto todo esfuerzo tendiente a eliminar esta forma de transmisión será infructuoso si no se capta la voluntad de todos los involucrados para el desarrollo de un programa integrado. Para que los laboratorios que controlan la sangre a transfundir realicen su tarea con eficiencia, es necesario introducir medidas que garanticen comprobadamente la calidad de los resultados, en todos los bancos de sangre.

La garantía de la calidad se implementa por medio de la ejecución de un conjunto de actividades que incluye desde la entrevista personalizada del donante, su identificación, obtención de la donación de sangre y de suero para los controles, hasta la transfusión inocua al receptor. Por ejemplo los procedimientos que garantizan la correcta identificación de las unidades de sangre reactivas en la primera prueba, que deben ser

descartadas, son esenciales para mantener la seguridad en la provisión de sangre.

1. Evaluación de los métodos serológicos

El criterio empleado para conocer el valor diagnóstico de una prueba usada para descartar sangre a transfundir, es evaluar su capacidad para distinguir una población de muestras provenientes de infectados de otra de no infectados.

Para el caso de algunas infecciones existe una prueba de referencia, en otros casos la evaluación debe hacerse en base a paneles de sueros de personas infectadas (cuando ha sido comprobada la presencia del agente infectante) y sueros de personas no infectadas. Al analizar el comportamiento serológico de dos poblaciones «ideales», donde una de ellas está constituida por muestras provenientes de personas infectadas y la otra de no infectados, si comparamos los resultados serológicos obtenidos en ambas (como títulos, absorbancias, etc.) con la frecuencia relativa (en porcentaje) con que estos se presentan, encontraríamos dos curvas gaussianas bien definidas.

Si observáramos los resultados de estas muestras hipotéticas con esta prueba serológica también hipotética en cuadro de doble entrada, veríamos:

INDIVIDUOS	Infectados (A)	Normales (B)	Total
PRUEBA			
Positiva	1000	0	1000
Negativa	0	1000	1000
Total	1000	1000	2000

Cuadro I - Resultados serológicos hipotéticos encontrados con una prueba ideal capaz de detectar a todos los individuos infectados (población A) y dar resultados no reactivos con la población de individuos normales (B).

Sin embargo éstos datos hipotéticos ideales no son como los que se observan en la rutina del diagnóstico serológico en los Bancos de Sangre. Para cualquier infección que se analice, suele observarse una superposición entre las curvas de distribución de los individuos normales (B) y los infectados (A).

a. **Sensibilidad (S)** - Definida como la proporción de muestras **positivas (reactivas)** correctamente identificadas por la prueba empleada.

$$S = \frac{\text{Positivos Verdaderos}}{\text{Positivos Verdaderos} + \text{Negativos Falsos}} \times 100$$

b. **Especificidad (E)** - Definida como la proporción de muestras **negativas (no reactivas)** correctamente identificadas por la prueba empleada.

$$E = \frac{\text{Negativos Verdaderos}}{\text{Negativos Verdaderos} + \text{Positivos Falsos}} \times 100$$

DEFINICIONES

- **Positivos Verdaderos (PV):** Resultados positivos (reactivos) obtenidos con las muestras de individuos infectados.
- **Positivos Falsos (PF):** Resultados positivos (reactivos) obtenidos por la prueba con las muestras de la población normal.
- **Negativos Verdaderos (NV):** Resultados negativos (no reactivos) obtenidos con las muestras de individuos normales.
- **Negativos Falsos (NF):** Resultados negativos (no reactivos) obtenidos por la prueba con las muestras de la población de infectados.
- **Prevalencia (de la infección) (P):** Proporción de individuos infectados en un momento dado en el total de la población estudiada.

Los datos de Prevalencia de cada infección se obtienen por áreas y para cada momento en el tiempo, generalmente en grandes muestreos epidemiológicos.

Otros parámetros importantes para evaluar una prueba son los de **Valores Predictivos** (de positivos y negativos) que tienen en cuenta, además de la sensibilidad

y especificidad de una prueba, la prevalencia de la infección en el área donde se usará.

c. **Valor Predictivo Positivo (VPP):** Es la probabilidad que tiene un individuo de estar infectado, cuando el resultado de la prueba ha resultado reactivo. Esta probabilidad se calcula según el teorema de Bayes:

$$\text{VPP} = \frac{S \times P}{S \times P + (1 - E) \times (1 - P)}$$

d. **Valor Predictivo Negativo (VPN):** probabilidad que tiene un individuo de no tener la infección que detecta la prueba, cuando el resultado de la misma es no reactivo.

$$\text{VPN} = \frac{E (1 - P)}{E (1 - P) + (1 - S) \times P}$$

De acuerdo a la prevalencia la enfermedad en poblaciones diferentes la misma prueba, con su sensibilidad y especificidad invariables, presentará valores predictivos positivo y negativo drásticamente modificados en las diferentes poblaciones.

e. **Determinación del Título de Corte (Cut-off)** Conocidas la sensibilidad y especificidad **en las condiciones de calibración elegidas y fijadas**, se selecciona el **Título de Corte** de la prueba para el reactivo y condiciones usadas.

El Título de Corte debe estar en una zona intermedia entre aquellas donde se ubican los resultados Reactivos (Positivos) y los No Reactivos (Negativos), de los sueros de referencia correspondiente. Habitualmente se calcula como el valor promedio de los resultados de los sueros Negativos + 2 o 3 desviaciones estándar de los mismos.

El Título de Corte deberá elegirse, para cada prueba y antígeno, de manera que asegure las características más adecuadas del ensayo para el propósito del diagnóstico serológico.

Por ejemplo, para realizar descarte de sangre para transfusiones podría aceptarse una baja proporción de Positivos Falsos pero ningún Negativo Falso.

2. Estudio estadístico de los datos serológicos

Medidas de posición y variabilidad de los datos.

Si se repite una medida con todos los cuidados recomendados, por un mismo operador y condiciones, los valores obtenidos no serán idénticos.

Esos valores se distribuirán alrededor de uno más frecuente, que cuando el número de medidas es suficientemente grande, la representación gráfica de estas frecuencias versus sus valores, se acerca a la clásica campana de Gauss o de distribución normal.

En esta distribución normal o gaussiana, el área comprendida entre la Media (X) \pm 1 Desviación Estándar representa cerca del 68% del área total. O sea, que el 68% de las mediciones se estiman comprendidas en ese rango.

Si se considera el área comprendida entre (X) \pm 2 desviaciones estándar, se abarca cerca del 95% de las mediciones.

Las medidas de posición que se definen son la **Media Aritmética o Media**, que es el valor promedio del conjunto de las mediciones; la **Desviación Estándar** considerada una medida del alejamiento de los datos del valor promedio y, el **Coefficiente de Variación**: que es la desviación relativa de los datos respecto del valor promedio. Los dos últimos miden la variabilidad o dispersión de los datos, o sea su Precisión.

3. Control de Calidad y Garantía de Calidad

a. Errores - Precisión - Exactitud

Los procesos analíticos, como todos los procesos productivos se hallan afectados por múltiples causas de error, que deben ser detectadas, para poder corregir los procedimientos. A esto apuntan todas las medidas de control y garantía de calidad que luego definiremos.

Los métodos serológicos y las mediciones que se realizan en el laboratorio, están afectados por errores de diverso origen que, de manera general, se agrupan en:

- **Errores aleatorios:** son impredecibles, inherentes a toda medición. Su mayor o menor magnitud es la **Precisión** del método o medición, es una medida de la **repetibilidad** de los mismos. Los resultados de un ensayo con alta precisión se hallan concentrados en torno a la media.
Los parámetros con que se cuantifica la precisión son las **Medidas de posición** vistas en el punto anterior.

- **Errores sistemáticos:** son errores importantes, que es posible prevenir. Son los generados por desempeño inapropiado del operador, uso de materiales inadecuados o defectuosos, aparatos mal calibrados, etc. Pueden ser detectados por Controles Externos y el parámetro que los mide es la **Exactitud**.

Generalmente se la define como la cercanía de los valores obtenidos con un método o mediciones al «verdadero valor» (Sesgo). Este verdadero valor sería el obtenido con un método patrón, al que se reconoce un sesgo igual a cero y con un significativo número de mediciones.

El análisis de estos errores puede también hacerse con gráficos (gráficas de Youden), mostrando las diferentes posibilidades:

Precisa y exacta:	Muestra un buen desempeño de la prueba y laboratorio que la realiza.
Imprecisa y exacta:	Muestra variaciones en el nivel de desempeño de las personas que la realizan. Puede mejorarse el desempeño con programas de control de calidad interno.
Precisa e inexacta:	Indica que el proceso es realizado en forma semejante pero se comete siempre el mismo error. Puede detectarse con programas de control de calidad externa.
Imprecisa e inexacta:	Indica la presencia de errores aleatorios y sistemáticos. Detectados por un programa global de control de calidad.

b. Control de Calidad y Garantía de Calidad

Es muy importante definir adecuadamente estos conceptos, porque su conocimiento es básico para programar las acciones que aseguren la confiabilidad de los resultados serológicos. La **calidad** de un producto o servicio se define como el conjunto de características que satisfagan las necesidades establecidas para ese producto o servicio (International Standardization Organization).

En el caso del diagnóstico serológico, la calidad está dada por la validez o confiabilidad de sus resultados.

- **Garantía de Calidad (Quality Assurance):** Se refiere a un programa completo que asegure que el resultado final informado por el laboratorio sea correcto y útil. Abarca las políticas que orienten la planificación de acciones tales como:
 - Organización establecida, del personal y de cada área, con responsabilidades bien definidas.
 - Establecimiento de Procedimientos Operativos Estándar para todas las tareas.
 - Documentación de detección de errores y las medidas correctivas adoptadas.
 - Entrenamiento y actualización permanente del personal.
 - Establecer metas de calidad y evaluar su cumplimiento.
- **Evaluación de la Calidad (Quality Assessment):** La evaluación del desempeño del laboratorio puede hacerse mediante diferentes técnicas de Control Externo, efectuadas por los Centros de Referencia en cada país.

Muchas veces se hace sinónimo de evaluación a una de esas técnicas, las **Pruebas de Desempeño (Proficiency Test)**, que es una forma de evaluación con encuestas de muestras control, programadas, como veremos en Control Externo.

- **Control de Calidad (Quality Control):** Representa las actividades y técnicas operativas desarrolladas para cumplir con los requisitos de calidad establecidos. Se refiere a los procedimientos de control que operan sobre cada uno de los múltiples factores que pueden incidir en los resultados del diagnóstico serológico.

c. Monitoreo de los procesos del diagnóstico

Todos los procesos analíticos deben controlarse mediante la comparación con sueros de control. Hay básicamente, dos maneras de hacerlo: con los controles diarios planificados por cada laboratorio (Control Interno) y con los programas interlaboratorio (Control Externo), planificados por un Laboratorio de Referencia.

4- Control Interno. Curvas de Control

El Control Interno (CI) de la calidad tiene por objetivo asegurar el cumplimiento de todos los procedimientos establecidos para el trabajo del laboratorio y el monitoreo de la precisión de los resultados (construcción de Curvas de Control) con el propósito de detectar y de corregir eventuales errores.

Un programa de Control Interno deberá contemplar los múltiples controles y acciones que señalados en este manual, el monitoreo diario de los procesos analíticos mediante sueros control y la construcción de curvas de control, como también la participación en programas de Control Externo.

Curvas de Control

El monitoreo diario del proceso analítico para cada prueba se hace por la evaluación de la precisión de la misma con sueros de control, construyendo curvas con la repetición diaria de los resultados de estos sueros.

Los **sueros de control** son sueros individuales o «pooles», preparados por cada laboratorio o por laboratorios de referencia, reactivos (bajo y alto) y no reactivos para la prueba que se controla, alicuotados y conservados de tal modo que se asegure contar con el mismo espécimen en repetidas mediciones diarias para unos meses como mínimo. Los sueros de control deben ser límpidos, libres de hemólisis, estar debidamente filtrados y siempre que sea posible, inactivados a 56° C por 30 minutos.

Para mantener la estabilidad de los mismos, asegurando que se incorpora al control diario réplicas idénticas de una muestra, se deben guardar alicuotados, congelados y pueden adicionarse estabilizantes y/o bacteriostáticos como: azida sódica, mertiolato, glicerina o etilenglicol.

- **Construcción de las *Curvas de Control*:**

En una primera etapa se deben calcular la Media y la Desviación Estándar para los sueros de control. Para esto se realizarán 30 determinaciones diferentes de los mismos y calcular **X** y **DX** como se explicó en el capítulo correspondiente. El gráfico tendrá entonces estas medidas como base, Las cotas inferior y superior para los valores serán **X ± 2 DS**.

La aplicación diaria de esta Curva, muy simple, permite al laboratorio observar, para cada prueba, cuando se producen irregularidades reflejadas en los valores del mismo suero de control repetido:

- i. El valor obtenido se halla fuera del límite **± 2 DS**.
- ii. Varios valores consecutivos muestran una tendencia al alza, o sea, valores cercanos al límite superior.

- iii. Varios valores consecutivos muestran tendencia a la baja, o sea, valores cercanos al límite inferior.

— Método de la Suma Acumulativa:

A partir de la Media calculada (tal como se calculó en la Curva de Control), réstese el valor hallado cada día con el suero de control, del valor de la Media y colóquese en el gráfico la diferencia. En una rutina normal, si los valores estuvieran próximos a la Media, encontraremos diferencias positivas y negativas, cuya suma debe ser cercana o igual a cero. En el caso de tener resultados anómalos, se observa una tendencia a la inclinación de la curva que será significativa cuando sobrepasa el límite de $\pm 2 \text{ DS}$.

— Análisis Fuera de Control y Medidas Correctivas.

Cuando los resultados de los sueros de control caen fuera de los límites establecidos, deberá contarse con un esquema de decisiones a tomar, según sea la anomalía que aparezca. Normalmente se rechaza el proceso cuando:

— Los resultados de los controles superan el límite de $\pm 2 \text{ DS}$.

— El 10% o más de los resultados de los suero de control se ubican consecutivamente cerca del límite superior, o bien consecutivamente cerca del límite inferior.

Cuando se detectan estos valores anómalos deberá revisarse todo el proceso para detectar el o los errores y tomar medidas correctivas.

BIBLIOGRAFÍA

Guía para el control de calidad de la serología para la detección de infecciones transmitidas por transfusión de sangre. (Hepatitis B y C, Sífilis, VIH y Tripanosomiasis Americana): opinión de un grupo de expertos. Resultado del taller OPS/OMS y Ministerio de Salud. Uruguay, 24-28 de mayo de 1993. PAHO/HPC/HCT/93.1.

Manual de diagnóstico serológico para la infección por VIH. OPS: Garantía de Calidad N° 42, 1995.

Control de Calidad en los Laboratorios Clínicos. Murali Dharan, Ed. Everté, 1980.

Capítulo X

SEROLOGÍA DE SÍFILIS

Liliana Urra Molina

CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN EL LABORATORIO DE SÍFILIS

El control de calidad en serología de sífilis asegura la obtención de resultados confiables y reproducibles dentro del laboratorio y en otros laboratorios que realicen las mismas técnicas.

El empleo de técnicas recomendadas y el uso de reactivos estandarizados eliminan la mayoría de los errores técnicos. El uso de sueros patrones de reactividad determinada detecta las variaciones diarias e indica la necesidad de acción correctiva.

Las medidas esenciales para la obtención de resultados confiables y reproducibles son:

- 1- Laboratorios limpios, bien iluminados, con temperatura controlada.
- 2- Equipos, instrumentos y material de vidrio adecuados en cantidad suficiente y equipos e instrumentos con programa de mantención y reparación.
- 3- Métodos adecuados de limpieza para material de vidrio.
- 4- Técnicas apropiadas, de acuerdo al tamaño del laboratorio y a la calificación del personal que realiza los exámenes.
- 5- Técnicas escritas para consultar y para ejecutarlas sin introducir modificaciones.
- 6- Medición exacta de las muestras y de los reactivos.
- 7- Uniformidad en los criterios para las lecturas de las muestras.
- 8- Control de reactivos:
 - a) Evaluación de nuevos lotes de reactivos antes de usarlos en rutina.
 - b) Preparación, etiquetado y mantención adecuada de los reactivos. Descartar los reactivos deteriorados o vencidos.
- 9- Mantención de sueros patrones de reactividad determinada para uso diario.

- 10- Uso de muestras satisfactorias para realizar los exámenes. Colección e identificación correctas, envío rápido al laboratorio después de su extracción, mantención en condiciones adecuadas, métodos de procesamiento adecuados.
- 11- Empleo diario de hojas de registro diseñadas para registrar con números las muestras y registrar los resultados de todos los exámenes realizados, número de lote de los reactivos, temperatura ambiente, persona que realizó el procesamiento de las muestras y quien las leyó. A medida que se leen las reacciones anotar los resultados de todos los controles y las muestras.
- 12- Revisión de los registros y de los informes para que no haya errores.
- 13- La participación en el Programa de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC) del Instituto de Salud Pública de Chile en forma periódica, puede detectar problemas al comparar sus resultados con los del laboratorio de referencia.
- 14- Asistencia del personal del laboratorio, a capacitación básica y a cursos de actualización.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE LA TECNICA R.P.R. EN TARJETA (CIRCULO) (RAPID PLASMA REAGIN)

I. ANTÍGENO R.P.R.

- Si la ampolla se transporta congelada, descongelar una sola vez.
- Temperatura del área de trabajo y de todo el material, incluyendo el antígeno debe ser de 23° - 29°C.
- La suspensión de antígeno no debe usarse más allá de la fecha de expiración.
- Antes de analizar las muestras la suspensión de antígeno debe controlarse con sueros controles de reactividad graduada.

II. MANTENCIÓN DEL ANTÍGENO

- Se recomienda guardar refrigerada la suspensión de antígeno (2° - 8°C).
- La ampolla con antígeno, sin abrir y refrigerada, se mantiene bien durante 12

- meses después de la fecha de manufactura. No debe congelarse.
- La suspensión de antígeno guardada en frasco plástico se mantiene bien hasta 3 meses si se guarda refrigerada entre 2° - 8°C.
- La suspensión de antígeno debe protegerse de la luz solar y temperatura sobre 29°C.

III. TARJETA DE DIAGNÓSTICO

- No tocar con los dedos el área dentro de los círculos para no engrasarla.
- Cada círculo debe usarse una sola vez.
- La tarjeta debe descartarse después de usada al igual que las que se observen sucias o arrugadas.

IV. FRASCO PLÁSTICO PARA REPARTIR EL ANTÍGENO

- Debe usarse con la suspensión de antígeno que trae la caja (estuche o kit).
- Se descarta al terminarse el antígeno.
- Debe anotarse en el frasco el número del lote, fecha de expiración antígeno y fecha en que se vació el antígeno de la ampolla al frasco plástico. Se recomienda anotar estos datos en una etiqueta adherida al frasco.

V. AGUJA PARA REPARTIR EL ANTÍGENO

- Precauciones están indicadas en el punto " Calibración de la aguja " de la Técnica Actualizada RPR.

VI. ROTADOR

- Determinar velocidad de 100 rpm. Si la velocidad este bajo 95 rpm o sobre 110 rpm, la reacción tiende a disminuir la intensidad en suero no diluido.
- Se debe controlar la velocidad del rotador cada vez que se trabaja en la técnica.

VII. CUBIERTA HUMEDCEDORA (provista de material absorbente)

- Saturar el material absorbente con agua destilada.
- Remover periódicamente este material, limpiar la cubierta y enjuagar con solu-

ción desinfectante para evitar contaminación.

VIII.- ÁREA DE TRABAJO

- La temperatura del área de trabajo y todos los materiales para la reacción deben estar entre 23° - 29°C.
- Debe ser bien iluminada y limpia.

IX.- LECTURA DEL TEST R.P.R.

- Debe hacerse **inmediatamente** después de la agitación en el rotador bajo fuente luminosa potente.
- No se debe leer el examen RPR con luz fluorescente porque las reacciones Reactivas Mínimas o Moderadas pueden omitirse.
- Antes de leer, rotar brevemente las tarjetas y moverlas hacia atrás y adelante 3 - 4 veces.

LIMITACIONES DE LA TÉCNICA R.P.R.

El diagnóstico de sífilis no debe hacerse basado sólo en un resultado reactivo sin el apoyo de la evidencia clínica. En el caso del test RPR las muestras reactivas deben someterse a cuantificación por el examen VDRL en lámina.

No se debe usar el test **RPR** en tarjeta para analizar líquido cefalorraquídeo.

No se debe analizar por el test **RPR** muestras de plasma por la interferencia que pueden producir los anticoagulantes.

Como en todas las técnicas que usan antígeno de cardiolipina, también se presentan reacciones falsas positivas en el test RPR.

El criterio recomendado por el “**MANUAL DE REACCIONES SEROLÓGICAS PARA SÍFILIS**”, en muestras hemolizadas también se aplica al test RPR en tarjeta “**una muestra está muy hemolizada para analizarse cuando no se puede leer la letra impresa a través de ella**”.

Además deben descartarse las muestras contaminadas y quillosas.

PROBLEMAS EN EL TEST RPR EN TARJETAS (CIRCULO)

CONDICIONES	CAUSA (s) POSIBLE (s)
Falsa Negativa	<ol style="list-style-type: none"> 1. Mal funcionamiento del rotador (velocidad o tiempo) 2. Exceso de suero. 3. Cantidad de antígeno insuficiente o excesivo. 4. Reactivos fríos (suero, antígeno) 5. Temperatura ambiente bajo 23°C. 6. Antígeno vencido. 7. Exceso de agitación del antígeno. 8. Antígeno poco sensible. 9. Error de lectura, especialmente en reactivo mínimo.

CONDICIONES	CAUSA (s) POSIBLE (s)
Falsa Positiva	<ol style="list-style-type: none"> 1. Suero se ha dejado secar antes de agregar el antígeno. 2. Rotación prolongada (más de 8 minutos). 3. Rotación bajo cubierta seca o sin cubierta. 4. Temperatura de los reactivos excesivamente altas. 5. Temperatura ambiente sobre 29°C. 6. Error de lectura. 7. Antígeno rugoso.

CONTROL INTERNO DE CALIDAD DE LA REACCION U.S.R.

1. ÁREA DE TRABAJO

La temperatura ambiente debe estar dentro del rango de 23 -29°C, al igual que la suspensión de antígeno, sueros controles, muestras y materiales necesarios, antes de iniciar el trabajo. A temperaturas superiores la sensibilidad de la reacción aumenta y a temperaturas inferiores disminuye.

2. REACTIVOS

a) Antígeno U.S.R.

- Debe guardarse a temperatura de 4 - 8°C y debe protegerse de la luz solar y de temperaturas sobre 29°C.
- La suspensión de antígeno no debe usarse más allá de la fecha de expiración y debe controlarse su reactividad estándar, de lo contrario los resultados son impredecibles.

b) Sueros controles:

- Se emplean para verificar la sensibilidad de la suspensión de antígeno.
- Debe mantenerse a temperaturas bajas (8 a 20°C).
- Pueden conservarse hasta 6 meses en un congelador a -20°C, 2 meses en el congelador del refrigerador y 15 días en el refrigerador (4 a 8°C).
- Los sueros controles se usan sólo en la jornada de trabajo, por lo que se recomienda alicuotar.

3. LÁMINAS DE VIDRIO

- Deben ser de vidrio neutro con anillos, de parafina, cerámica o vidrio, de 14 mm. de diámetro.
- El área dentro de los círculos no se debe tocar para no engrasarla.

— Las láminas rayadas u opacas se descartan porque producen error en las lecturas.

4. AGUJA

La aguja para repartir el antígeno debe estar calibrada para rendir 45 ± 2 gotas por ml.

5. ROTADOR

Debe ajustarse a 180 ± 2 r.p.m. y debe circunscribirse un círculo de 19 mm. de diámetro en un plano horizontal.

6. TÉCNICA

La técnica debe seguirse sin introducir modificaciones ni alterar el orden de los procedimientos.

- a) Suspensión de antígeno:
Se controla con sueros patrones. Si resulta poco sensible o excesivamente sensible se debe descartar y emplear otra que dé el patrón de lectura con los sueros controles.
- b) Calibración de agujas:
Las agujas deben controlarse cada vez que se realice la técnica.
- c) Revisión de las muestras:
Las muestras de suero que estén excesivamente hemolizadas (que no se pueda ver letras impresas en un papel a través del suero), así como contaminadas o quilosas deben descartarse.
Esta técnica no se realiza en líquido cefalorraquídeo.
- d) Tiempo de rotación:
Cuatro minutos a 180 r.p.m. y debe controlarse la velocidad del rotador cada vez que se realiza la técnica para no tener resultados erróneos.
- e) Lectura:
Debe hacerse inmediatamente, después de la agitación en el rotador, en un microscopio que tenga aumento 100x.

7. LAVADO DE MATERIAL

- Debe realizarse separado del resto del material del laboratorio.
- Las láminas usadas deben descontaminarse en una solución hipoclorito de sodio al 0,5%-1%, luego lavarse con detergente neutro caliente para eliminar la parafina y enjuagar con agua de la llave y agua destilada.
- Posteriormente deben desengrasarse con una tórula con alcohol, frotándola con firmeza. Si las láminas quedan con restos de detergente, el pH alcalino baja la reactividad de la reacción.
- La jeringa y la aguja deben lavarse con agua; agua destilada, alcohol, acetona y dejar secar al aire.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO DE LA TECNICA V.D.R.L.

1. ÁREA DE TRABAJO

La temperatura ambiente debe estar dentro del rango de 23 -29°C ; todos los materiales y reactivos para la preparación de la suspensión de antígeno, sueros controles, muestras deben alcanzar dicha temperatura antes de iniciar el trabajo. A temperaturas superiores aumenta la sensibilidad de la reacción y a temperaturas inferiores disminuye.

2. REACTIVOS

a) Antígeno V.D.R.L.

- No debe tener cristales de colesterol (láminas sedimentadas o partículas en suspensión); si esto ocurriera por las bajas temperaturas, debe procederse a disolverlos en baño María, agitando suavemente y cuidando de no sumergir el frasco para que no le entre agua.

En caso de no reproducir el patrón de reactividad estándar, debe descartarse. Debe guardarse a temperatura ambiente.

b) Solución salina amortiguada V.D.R.L.

- Cuando ocurra un cambio inexplicable en la reacción, verifique el pH de esta solución a fin de determinar si este factor ha contribuido al cambio. La solución salina amortiguada que esté fuera del rango de pH $6.0 \pm 0,1$ o que contenga hongos debe descartarse.

c) Solución salina al 0,9%

- Debe ser fresca; **no debe usarse más allá de una semana de preparación.**
- El cloruro de sodio usado en esta solución debe desecarse previamente a $160^{\circ} - 180^{\circ}\text{C}$.

d) Solución salina al 10%

- Se usa para sensibilizar la suspensión de antígeno en la técnica V.D.R.L. para L.C.R.
- El cloruro de sodio debe desecarse previamente igual que en punto c).

e) Sueros control

- Se emplean para verificar la sensibilidad de la suspensión de antígeno.
- Deben mantenerse a bajas temperaturas ($8^{\circ} - 20^{\circ}\text{C}$).
- Pueden conservarse hasta 6 meses en un congelador a -20°C , 2 meses en el congelador del refrigerador y 15 días en refrigerador ($4^{\circ} - 8^{\circ}\text{C}$).
- Los sueros controles se usan sólo en la jornada de trabajo, si sobran deben descartarse, ya que los congelamientos y descongelamientos sucesivos alteran su nivel de reactividad. Por ello es aconsejable fraccionarlos en alícuotas.

3. LÁMINAS DE VIDRIO

- Deben ser de vidrio neutro con anillos, de parafina, cerámica o vidrio, de 14 mm. de diámetro.
- El área dentro de los círculos no se debe tocar para no engrasarla.
- Las láminas rayadas u opacas se descartan porque producen error en las lecturas.

4. AGUJA

La aguja para repartir el antígeno debe estar calibrada para rendir 60 ± 2 gotas por ml.

Si no rinde el número de gotas especificadas se debe ajustar ya sea abriendo el orificio si el número de gotas es mayor o cerrándolo si el número de gotas es menor.

5. ROTADOR

Debe circunscribir un círculo de 19 mm. de diámetro en un plano horizontal y debe ajustarse a 180 ± 2 r.p.m.

6. TÉCNICA

La técnica debe seguirse sin introducir modificaciones ni alterar el orden de los procedimientos.

a) Suspensión de antígeno:

Si resulta poco sensible o excesivamente sensible se debe descartar y emplear otra que dé el patrón de lectura con los sueros controles.

b) Calibración de aguja:

Las agujas deben controlarse **cada vez** que se realice la técnica.

c) Revisión de las muestras:

Las muestras de suero que estén excesivamente hemolizadas (que no se pueda ver letras impresas en un papel a través del suero), así como contaminadas o quilosas deben descartarse. Muestras de líquido cefalorraquídeo contaminados o con sangre deben descartarse.

d) Tiempo de rotación:

Cuatro minutos para muestra de suero y ocho minutos para muestra de líquido cefalorraquídeo. La velocidad del rotador debe controlarse cada vez que se realiza la técnica para no tener resultados erróneos.

e) Lectura:

Debe hacerse inmediatamente, después de la agitación en el rotador, en un microscopio que tenga aumento 100x. El microscopio debe estar en perfectas condiciones ópticas.

7. LAVADO DE MATERIAL

- Debe realizarse separado del resto del material del laboratorio.
- Las láminas usadas deben descontaminarse en una solución hipoclorito de sodio al 0,5%-1%, luego lavarse con detergente neutro caliente para eliminar la parafina y enjuagar con agua de la llave y agua destilada.

Posteriormente deben desengrasarse con una tórula con alcohol, frotándola con firmeza. Si las láminas quedan con restos de detergente, el pH alcalino baja la reactividad de la reacción.

- La jeringa y la aguja deben lavarse con agua, agua destilada, alcohol, acetona y dejar secar al aire.
- El frasco donde se prepara la suspensión de antígeno debe lavarse con detergente neutro, enjuagar bien con agua destilada y desengrasar con alcohol.

8. MANTENCIÓN Y CONTROL DEL EQUIPO

- La temperatura del baño termorregulador debe verificarse cada vez que se use. **Debe permanecer estable a 56°C.** El nivel de agua debe cubrir el nivel de las muestras para evitar tener muestras rugosas o falsas positivas.
- La velocidad del rotador debe ser comprobada antes de usarlo y durante su uso, y **debe mantenerse en 180 r.p.m.**

BIBLIOGRAFÍA

Hunter E, Kennedy E, Creighton E. Quality Control. In A Manual Of Tests For Syphilis: Ed. Laursen SA, Hunter EF, Krauss SJ. Washington: St Mary's Press, 1990.

Capítulo XI

PROCEDIMIENTOS GENERALES DE CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO, CON ESPECIAL ÉNFASIS EN QUÍMICA CLÍNICA Y HEMATOLOGÍA

Aurora Flores Crocco, Valeria Cepeda Carrillo



PROCEDIMIENTOS GENERALES DE CONTROL DE CALIDAD EN EL LABORATORIO CLÍNICO, CON ESPECIAL ÉNFASIS EN QUÍMICA CLÍNICA Y HEMATOLOGÍA

Las medidas necesarias para observar y controlar las variaciones en el laboratorio de salud, lo constituyen los **PROGRAMAS DE CONTROL DE CALIDAD**.

Todos los laboratorio clínicos deben tener un sistema que permita evaluar la calidad del trabajo.

El control de calidad involucra una serie de aspectos que deben considerarse, tales como:

- 1.- Identificación, transporte y almacenamiento de la muestra.
 - a.- Obtención de la muestra (manipulación e identificación).
 - b.- Transporte al laboratorio.
 - c.- Almacenamiento de la muestra.
- 2.- Método de análisis (procedimientos y reactivos).
- 3.- Mantenimiento y calibración de instrumentos.
- 4.- Registro de actividades (preparación de reactivos, inscripción y mantención de equipos)
- 5.- Disponer de manuales de procedimientos actualizados y al alcance del personal.
- 6.- Disponer de normas y prácticas de seguridad y de bioseguridad.
- 7.- Implementación de un programa de control de calidad interno (diario, retrospectivo)
- 8.- Participación en un programa de control de calidad externo

- 9.- **Asignación de un profesional supervisor de control de calidad** que a) asegure que los procedimientos de control en uso se apliquen adecuadamente b) proporcione capacitación y asistencia al personal c) examine los datos de control y d) especifique cuándo y cómo deben aplicarse acciones correctivas.
- 10.- Programa de capacitación y educación continua del personal del laboratorio con respecto a los efectos fundamentales del control de calidad.

El control estadístico es de utilidad en el laboratorio para mantener un rendimiento aceptable por medio de la medición, evaluación, corrección y documentación de la variabilidad del proceso analítico.

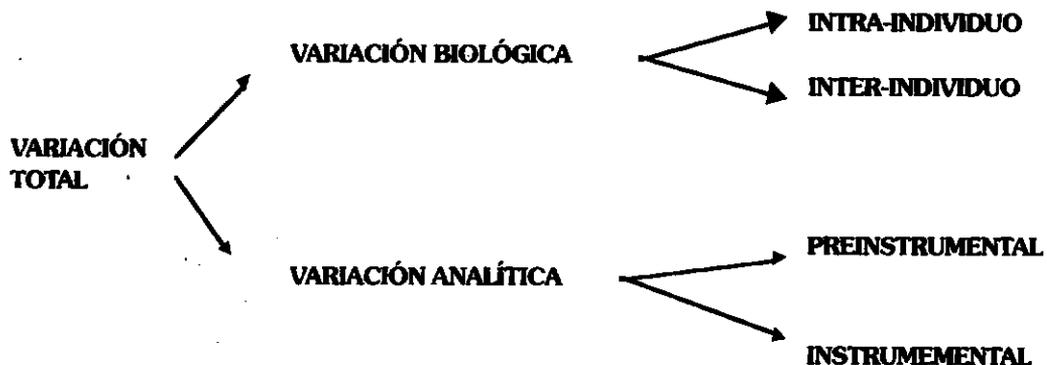
MEDIDAS PREVENTIVAS PARA EL CONTROL DE LA VARIACIÓN

Con el propósito de poder aplicar medidas preventivas en el control de la variación es necesario conocer las posibles fuentes de variación de un proceso analítico

FUENTES DE VARIACIÓN

Se pueden clasificar en fuentes de variación biológicas y analíticas, cada una con numerosas subdivisiones.

Fig. N° 1



VARIACIÓN BIOLÓGICA

Variación Interindividuo:

Se refiere a las diferencias en el nivel verdadero de un constituyente, entre individuos. Como las poblaciones son heterogéneas, en la práctica se las subdivide por: edad, sexo, raza, hábitos alimenticios, etc.

Variación Intra-individuo:

Incluye todos los fenómenos regulatorios y en particular todos los ritmos biológicos, edad, estado nutricional etc., generalmente se producen variaciones en los resultados de laboratorio en relación a estos fenómenos. Es difícil separar las fuentes de variación por estar estrechamente relacionadas.

Además de las fuentes de variación intra e inter-individuo existen variaciones debidas al ambiente y a factores exógenos y endógenos.

VARIACIÓN ANALÍTICA

Preinstrumentales:

Son la sumatoria de las fuentes de variación, desde la obtención de la muestra hasta que la muestra ingresa al sistema analítico, incluyendo los errores administrativos y aquellos inherentes a las muestras.

Instrumentales:

Se producen debido a las condiciones del ambiente del laboratorio y del método de análisis.

Las fuentes de variación analítica se deben a errores sistemáticos o determinados y a errores aleatorios o indeterminados.

Errores sistemáticos:

Aquellos que influyen las mediciones en la misma dirección y en la misma magnitud. Son errores originados por causas identificables y corregibles.

Errores aleatorios:

Variaciones impredecibles que influyen en cada medición en forma diferente. La habilidad para detectar estos errores mediante técnicas de control de calidad es limitada, pues por su naturaleza se producen al azar y en forma esporádica. Requieren de análisis estadísticos para su resolución.

OBTENCIÓN, TRANSPORTE Y MANEJO DE MUESTRAS

Los procedimientos incorrectos de obtención del material biológico del paciente pueden causar una variación en el resultado que supera cualquier variación analítica que ocurre en el laboratorio. De igual manera, después de la colección de la muestra y durante su transporte al laboratorio, pueden ocurrir cambios que invaliden el análisis final.

Una vez que la muestra llega al laboratorio, el analista debe controlar las técnicas que se utilizan para manejarlo.

Ejemplos:

- a.- Confusiones entre muestras de distintos pacientes: se debe controlar la rotulación del envase que contiene el espécimen: nombre del paciente, fecha, edad, entre otras.
- b.- Debe ponerse especial énfasis en aquellas precauciones necesarias para evitar alteraciones en la composición de las muestras biológicas en esta etapa.; no hay que subestimar la evaporación de líquidos de los tubos abiertos que contienen las muestras; dicha evaporación puede aumentar significativamente la concentración de componentes sanguíneos por la pérdida del contenido de agua.

Muchos componentes de las muestras biológicas se alteran cuando son expuestos a la luz (ej. bilirrubina). Se debe evitar la luz solar fuerte (directa). Otros, son termosensibles debiendo evitarse temperaturas extremas (ej. enzimas).

Libro diario de Control de Calidad del Laboratorio

En principio, al implementar una técnica debe registrarse todo aquello que se crea pueda ser relevante hasta que se tenga confianza en el método; posteriormente se puede ser más selectivo.

Es esencial registrar los cambios de reactivos y calibradores, cambios en el personal que lleva a cabo el procedimiento y alteraciones en los instrumentos.

Esta información es de gran ayuda para interpretar las alteraciones de la variación.

MÉTODO ANALÍTICO

Se define un método analítico como un conjunto de instrucciones que describen el procedimiento, materiales y equipo necesario para que el analista pueda obtener un resultado.

Para escoger un determinado método analítico es necesario considerar las siguientes características:

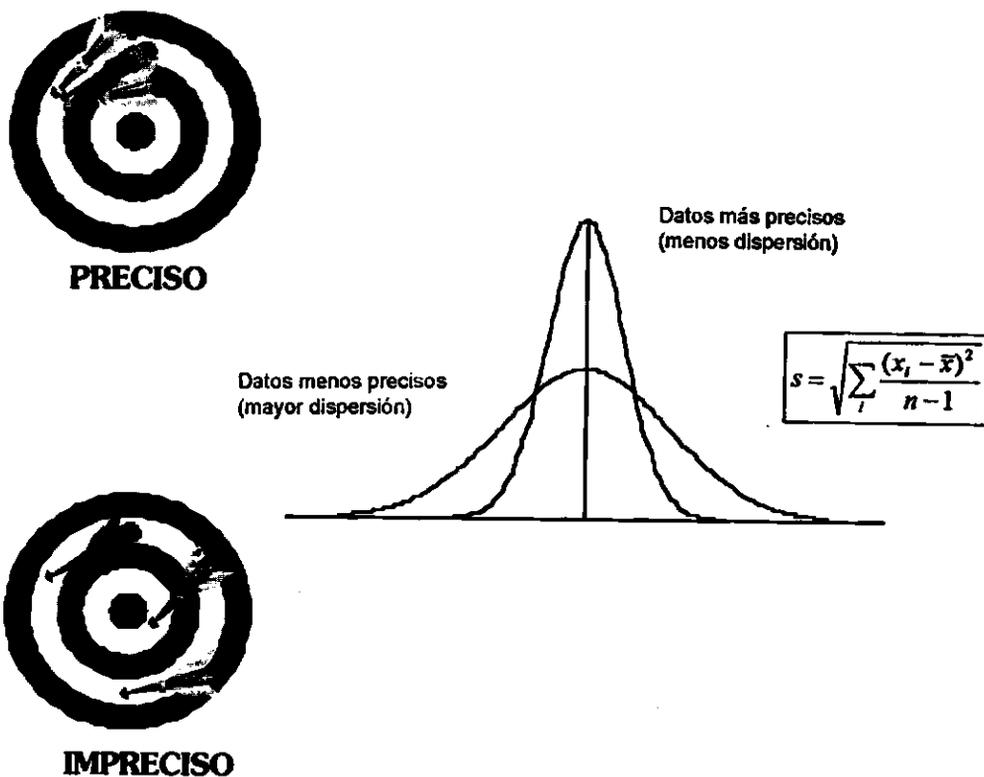
- a).- Precisión
- b).- Exactitud
- c).- Rango analítico
- d).- Especificidad
- e).- Sensibilidad
- f).- Límite de detección
- g).- Límite de cuantificación
- h).- Interferencias
- i).- Practicabilidad, rapidez, seguridad y costo

a) PRECISIÓN

Aproximación entre los valores obtenidos por repetición

Son varios los factores que influyen en la precisión de los resultados, y durante la evaluación deben mantenerse constantes. Por ejemplo: usar el mismo lote de reactivos; los mismos calibradores, instrumentos y analistas. Deben tomarse precauciones para que no varíe la exactitud durante el período de prueba.

FIG. Nº 2



Para determinar la precisión se realizan dos pruebas.

- a.- Se mide la diferencia entre resultados de duplicados obtenidos de varias muestras diferentes.
- b.- Se mide la precisión de resultados de muchas repeticiones efectuadas sobre la misma muestra.
La naturaleza de la muestra y su ubicación dentro de una corrida analítica son importantes. Es preferible que el analista no identifique los duplicados.

PRECISIÓN DENTRO DE LA CORRIDA

Útil para hacer una rápida evaluación de la precisión de un método y comparar la exactitud de 2 métodos.

- 1.- Seleccione un número entre 20 y 100 muestras de pacientes y analíselos por duplicado por un método candidato y uno de comparación.
- 2.- Calcule la desviación estándar (DE):
 - a) Los duplicados obtenidos por ambos métodos de todas las muestras
 - b) Desviación estándar de la muestra con resultados en la parte baja del rango analítico
 - c) Desviación estándar de la muestra con valores altos.

Se registran: la media y el número de pares de duplicados para cada rango, y se realiza una prueba de significancia estadística para ver las diferencias de variación

PRECISIÓN INTER - DÍA

- Seleccione un número (no inferior a 3) de muestras que abarque el rango analítico del método.
- Deben alicuotarse y congelarse a -20°C , adecuadamente rotuladas.
- Hacer 20 determinaciones, una diaria. (Debe chequearse si hay cambios de exactitud durante este período).
- Se calcula DE de los 20 resultados después de excluir errores identificables. Para los tres niveles de concentración se calculan las desviaciones estándar.
- La imprecisión puede verse influida por: presencia de compuesto interferentes y en el caso de las enzimas por la presencia de isoenzimas en proporción variable.

Antes de recomendar un método, deben repetirse estas pruebas por otro laboratorio independiente. Si concuerdan los resultados puede adoptarse el método, de lo contrario habrá que seguir investigando.

MATERIAL NECESARIO

Se debe utilizar una variedad de muestras de pacientes, que representen a aquellos recibidos de rutina. Este material es inestable y sólo se puede utilizar en estudios de replicados por cortos periodos (ej. entre corridas o durante un día).

Para realizar estudios mas prolongados, debe utilizarse material de control, que es más estable y más fácil de usar en estudios de imprecisión sobre la concentración; pero los resultados sólo se aplican al material usado. Los replicados deben ser colocados al azar entre las muestras de pacientes y no en secuencia, para incluir el efecto de arrastre.

b) EXACTITUD

La exactitud de un método es la **concordancia del valor medio calculado de una magnitud con el valor verdadero.**

Los métodos para controlar exactitud son:

- a) Pruebas de recuperación
- b) Cálculo de la media diaria a partir de muestras de pacientes
- c) Determinación en muestras de sujetos sanos
- d) Uso de material de control

TABLA Nº 1

CONTROL DE EXACTITUD

CONSTITUYENTE:..... UNIDAD:.....
 MÉTODO:..... OPERADOR:.....
 INSTRUMENTO:.....

Fecha	Suero	Nº Lote	Valor asignado(VA)	Valor hallado (VH)	% E	Se acepta S/NO	FRMA

$$\% E = \frac{VA - VH}{VA} \times 100$$

RANGO ANALÍTICO

Rango de concentración u otra cuantía del constituyente, en el cual el método se aplica sin introducirle modificaciones, se chequea a través de la linealidad experimental.

Esta consiste en analizar varias diluciones de calibrador, o mezclas graduadas de dos muestras, una de un valor alto y otra de un valor bajo. Las enzimas pueden inactivarse por dilución en solventes, por lo que debe chequearse la linealidad de la actividad enzimática, mezclando muestras y elaborando curvas de actividad enzimática v/s tiempo, para muestras con diferentes actividades enzimáticas.

La linealidad siempre debe chequearse, jamás suponerse. Idealmente la curva de calibración (gráfico de respuesta v/s concentración del analito) debe ser lineal y pasar por el origen. El rango analítico debe ser de una amplitud tal que incluya el 95% de los resultados esperados de muestras clínicas sin prediluir.

RANGO DE MEDICIÓN

Es un rango en la escala de medición definido por un valor alto y límites de incertidumbre.

d) ESPECIFICIDAD.

Capacidad de un procedimiento analítico para determinar solamente el analito que se desea medir. Algunos métodos son inexactos o entregan resultados falsamente elevados debido a que existen otros componentes distintos del analito de la muestra que contribuye a la lectura.

Estas limitaciones deben estar descritas en el método, sin embargo en principio, cualquier droga y alimento podría incidir en la especificidad de un método analítico.

e) LIMITE DE DETECCIÓN.

Es la concentración más baja de analito que puede ser detectado, pero no necesariamente cuantificado, en las condiciones experimentales establecidas para el método. Se determina la señal o ruido. Se acepta generalmente una relación señal: ruido de 2:1 o

3:1, en otras palabras con probabilidad del 95%, puede distinguirse de un blanco apropiado.

f) LIMITE DE CUANTIFICACIÓN

Es la mínima concentración de analito que puede ser determinada por una precisión y exactitud aceptable. El límite de cuantificación determina el punto de concentración más bajo de la curva de calibración.

g) INTERFERENCIAS

Este es el efecto de un componente presente en la muestra sobre el analito dañando la exactitud de la medición. Este componente puede influir en forma positiva (aumentando el resultado de la medición) o negativa (inhibiéndolo).

h) PRÁCTICA OPERACIONAL

La información en cuanto a si el método es factible de realizar. Se obtiene a través de experiencia lograda al familiarizarse con la técnica.

i) SEGURIDAD

Deben considerarse riesgos físicos: seguridad eléctrica y mecánica; riesgos químicos: provocados por compuestos inflamables, explosivos, venenosos, carcinogénicos o radioactivos y el riesgo biológico producido por la muestra.

TIEMPO

Debe considerarse:

- Tiempo necesario para efectuar el análisis tanto un analista entrenado como no entrenado en la técnica.
- Número de muestras que pueden analizarse normalmente, por hora, día o semana.

La velocidad puede ser variable, y hay que determinar cual es su influencia sobre la exactitud.

COSTO

Debe incluirse el costo en reactivos, horas/hombre, capital y costo de ejecución (mantención, preparación e insumos de instrumentos); debe considerarse el costo por muestra analizada y la máxima velocidad de ejecución del examen.

DESCRIPCIÓN DE UN MÉTODO ANALÍTICO

Se requiere la siguiente información:

- a) Fundamento del método, con referencia de la literatura.
- b) Especificación de instrumentos y equipos.
- c) Lista de reactivos con concentraciones y su límite de tolerancia expresado en unidades del sistema internacional (S.I.), pureza si es posible.
- d) Requerimiento de muestra, incluyendo volumen, naturaleza, anticoagulantes, y condiciones de almacenamiento.
- e) Protocolo de análisis, paso a paso, indicando las etapas críticas (Ej.: volumen, tiempos, temperatura, longitud de onda, etc.)
- f) Procedimiento de calibración y cálculo de resultados.
- g) Rango analítico, esto es, rango de concentración u otra cantidad de la muestra sobre el cual el método es aplicable sin introducirle modificaciones.
- h) Indicaciones de cómo tratar las muestras que caen fuera del rango.
- i) Precisión y exactitud.
- j) Precauciones de seguridad en el manejo de la muestra. Preparación de reactivos, cómo descartarlos y métodos apropiados de descontaminación del material.

ESTANDARIZACIÓN DE UN MÉTODO

CURVAS DE CALIBRACIÓN

La exactitud de un grupo de resultados puede ser afectada por errores de calibración. Cuando se comparan dos métodos, se recomienda usar el mismo juego de calibradores para ambos.

En el análisis no estequiométrico, la concentración de la sustancia por analizar es un valor desconocido. Esta se determina comparando la medición de alguna característica física (absorbancia), con mediciones similares de concentraciones conocidas de la sustancia en el mismo disolvente.

Aunque esas comparaciones se pueden hacer usando sólo un calibrador se recomienda efectuar una **CURVA DE CALIBRACIÓN**, la cual se puede ir chequeando con un mínimo de 3 puntos: bajo, medio y alto, verificando así que las condiciones analíticas se han mantenido. Estas curvas verifican la sensibilidad y linealidad de rendimiento de la prueba.

Resumiendo, son muchos los factores que pueden afectar el rendimiento del análisis. Se deben preparar curvas de calibración o validar las curvas existentes cada vez que se realiza la prueba.

Al realizar una curva de calibración se prepararan varias concentraciones de la sustancia por analizar, utilizando material de vidrio escrupulosamente limpio, evitando así introducir interferencias. Los calibradores patrones deben ser solamente sustancias químicas de pureza certificada. Las alícuotas se pueden medir volumétrica o gravimétricamente en base a una solución comercial. El diluyente también se debe medir con exactitud. Si el diluyente no es un medio químicamente definido, se usa la expresión «patrón secundario».

La expresión «calibrador» incluye los patrones primario y secundario y reemplaza a la expresión «patrones» que antes era de uso común.

Todas las concentraciones del calibrador se analizan con exactamente el mismo procedimiento utilizado para todas las muestras que se leerán de la curva. Se verifican los reactivos a fin de determinar si muestran signos de deterioro y si están dentro de las

fechas de vencimiento tratándose de reactivos de diagnóstico. Se debe leer el protocolo más reciente incluido con los productos a fin de conocer las condiciones de almacenamiento y uso. Los fabricantes a veces modifican los procedimientos de prueba, los reactivos, las recomendaciones de almacenamiento, etc. El estuche de pruebas debe ir acompañado de instrucciones actualizadas.

Se preparan los reactivos siguiendo estrictamente las instrucciones del método. Se debe usar solamente recipientes y aparatos de medición limpios; agua destilada o desionizada para el material de vidrio y recipientes volumétricos; pipetas, termómetros y/o cronómetros calibrados exactamente.

Los procedimientos enunciados deben ser seguidos en forma idéntica al trabajar con los calibradores, el material de control y las muestras a procesar.

Se tabulan los resultados, se preparan gráficos y se formulan comentarios respecto al desarrollo de la prueba.

Para la confección del gráfico se eligen concentraciones del calibrador que contemplen la amplitud prevista, con pequeños márgenes por encima y por debajo.

Se expresa gráficamente la lectura de absorbancia (eje Y) de cada concentración (eje X) en papel cuadrículado.

Los puntos deben configurar una línea recta, que es mejor calcular y dibujar con la pendiente y la intersección obtenidas por el método de los mínimos cuadrados.

El valor de absorbancia de una muestra tratada, de concentración desconocida, se ubica en el eje Y en la curva de calibración y se busca la concentración en el punto correspondiente del eje X.

Para validar una curva de calibración y verificar el procedimiento, se procesan los calibradores con las muestras. Se espera que los valores se sitúen dentro de $\pm 5\%$ de la concentración de acuerdo con la curva. (No se usa el calibrador para modificar la curva a fin de que se ajuste al valor del procedimiento singular).

Todos los valores obtenidos como resultado del análisis de la muestra de pacientes, se leen o calculan en base a una curva de calibración generada con varios puntos.

A veces no existe una relación rectilínea entre absorbancia y concentración en los extremos de la curva (concentraciones sumamente altas o bajas).

Cuando el gráfico indica esta situación, se usa solamente la región rectilínea del gráfico. Se debe poner a prueba cada método a fin de determinar los límites de linealidad en el laboratorio en el cual se la aplican.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO RETROSPECTIVO

Los procedimientos de control de calidad generalmente monitorean la exactitud y precisión de los métodos analíticos. Estos procedimientos deben ser capaces de evaluar la variación a la que podría estar sujeto un resultado observado.

Para realizar estas observaciones se debe analizar el mismo material cada día durante un largo período y comparar los resultados.

Este resumen se refiere a un método analítico como si nunca se hubiera utilizado previamente y se lo considera para uso de rutina por primera vez.

Las técnicas de control de calidad se aplican al método en etapas. La progresión de una etapa a otra no debe realizarse sin un total conocimiento de ella. Cualquier problema suscitado en una de las etapas debe ser resuelto y el control debe ser satisfactorio, antes de proseguir.

Variación de las condiciones óptimas.	Etapas I
Variación de las condiciones de rutina - valores conocidos.	Etapas II a
Variación de las condiciones de rutina - valores desconocidos.	Etapas II b
Utilización estadística de resultados de los pacientes.	Etapas III
Control de calidad externo.	Etapas IV

ETAPA I

Variación de las Condiciones Óptimas (VCO)

La **variación de las condiciones óptimas** es la variación que un laboratorio individual puede tener en un procedimiento analítico particular.

Se deben realizar aproximadamente 20 análisis para obtener la VCO. El objetivo es tratar de repetir los análisis en condiciones analíticas ideales y constantes. Se deben

tomar todas las medidas preventivas posibles en forma rigurosa.

A continuación se indican algunas de ellas, (éstas pueden no ser las más adecuadas para todos los procedimientos de laboratorio, pero pueden servir de guía):

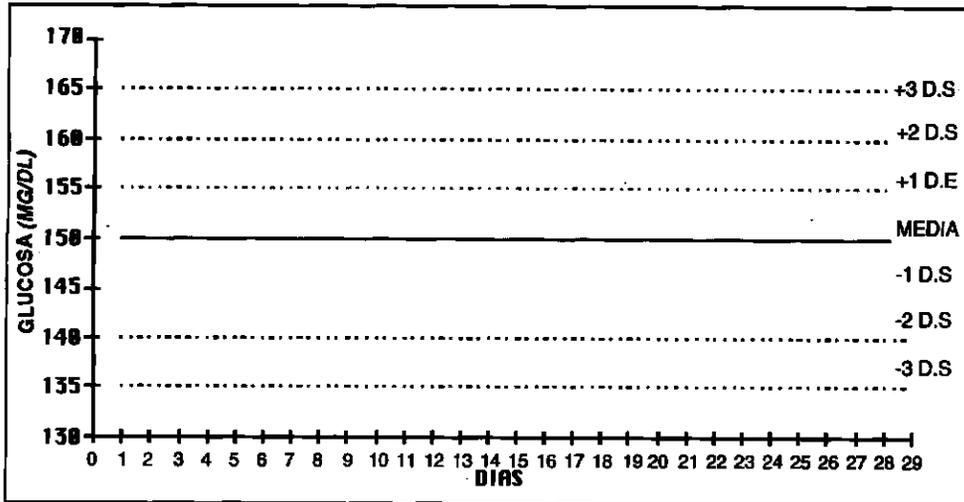
- 1.- Utilizar el mismo instrumento para todas las determinaciones.
- 2.- Utilizar reactivos frescos, bien preparados y controlados.
- 3.- Realizar los análisis con material de control estable, homogéneo y no vencidos.
- 4.- Tapar el frasco que contiene el control en forma hermética, después de sacar una alícuota.
- 5.- Para reconstituir material liofilizado utilizar material volumétrico adecuado (pipeta volumétrica clase A).
- 6.- Controlar las lecturas de los instrumentos y los cálculos efectuados.
- 7.- Realizar los análisis en el menor tiempo posible.
- 8.- Controlar cuidadosamente la temperatura y el tiempo.
- 9.- Evitar situaciones extremas del medio ambiente del laboratorio: luz, temperatura, humedad.
- 10.- Asegurarse que los reactivos se hallan homogeneizado adecuadamente.
- 11.- Operador con experiencia.
- 12.- Elegir un nivel de concentración del material de control que esté en el rango de importancia clínica.

Se debe calcular la media y desviación estándar de los 20 análisis realizados y los resultados individuales deben ser marcados en un cuadro de control.

En la carta control se dibujan cinco líneas horizontales, una en la media de los valores observados, dos sobre y dos debajo de la media a dos y tres desviaciones estándares (DE) de la media (Ver ejemplo en Figura N° 3).

FIGURA Nº 3

CARTAS DE CONTROL Y LÍMITES DE CONTROL



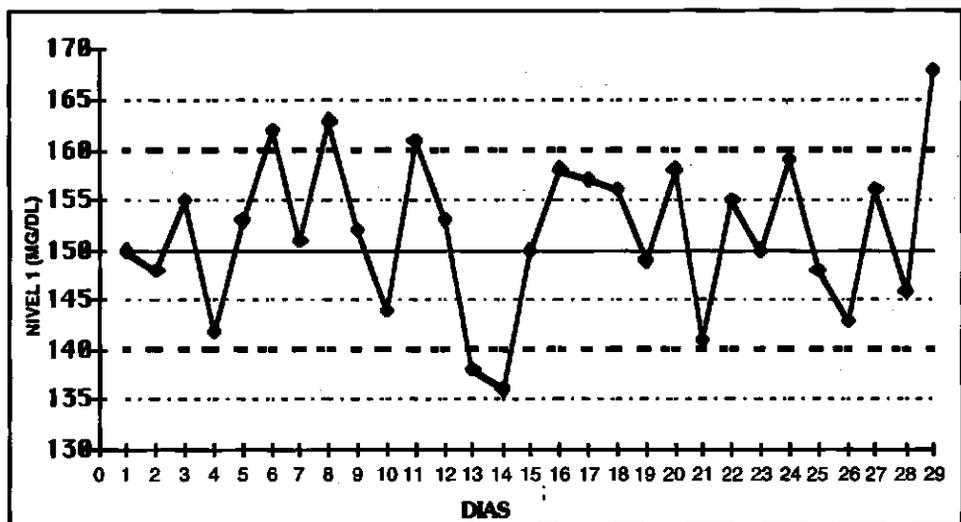
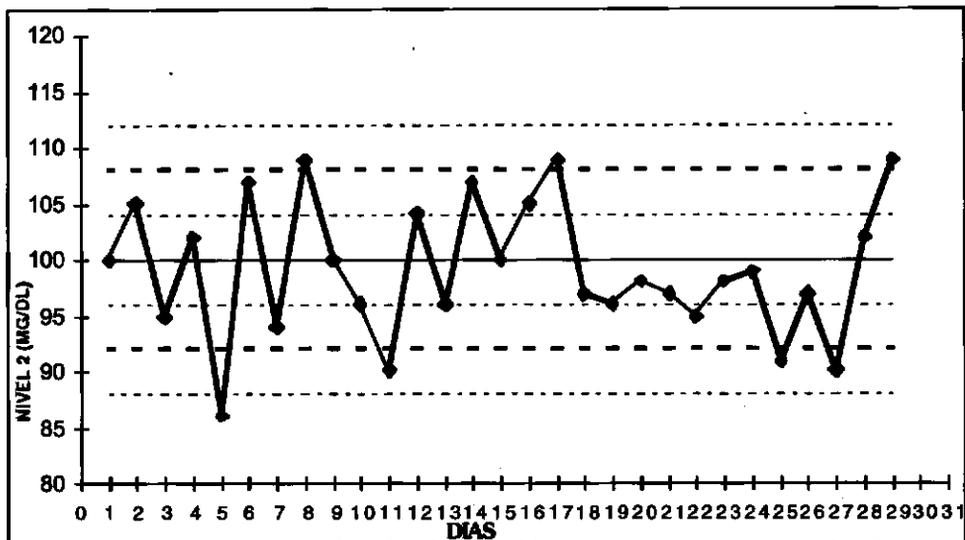
La teoría estadística indica que aproximadamente uno de veinte (5%) de los resultados caerá fuera de la línea horizontal trazada en $\pm 2DE$.

Además los resultados caerán aproximadamente en igual número de cada lado de la media y aproximadamente dos de tres resultados se hallarán dentro de $\pm 1 DE$. Son raros los resultados que caen fuera de $\pm 3DE$, esto se produce una vez en 400 resultados. Es importante y necesario graficar los resultados, puesto que el ojo humano es un detector muy sensible de tendencias y cambios en los valores. Deben ubicarse las tendencias en los resultados y la distribución anormal de ellos durante la evaluación de VCO.

De haber tendencia debe buscarse la causa y resolver el problema antes de proseguir con la siguiente etapa.

La Figura 4 muestra dos ejemplos no satisfactorios de control.

FIGURA N° 4



ETAPA II

VARIACIÓN DE LAS CONDICIONES DE RUTINA (VCR):

La variación que se produce en los resultados del material de control al realizar una técnica en las condiciones de trabajo diario.

Se divide en dos partes: a) análisis del material de control cuyos valores son conocidos para el operador y b) análisis de los resultados cuando los valores esperados son desconocidos para el operador.

ETAPA IIa

Variación de los condiciones de rutina: Con valores conocidos (VCRC)

El material de control utilizado para determinar los valores en condiciones óptimas se somete al procesamiento analítico en condiciones de rutina.

Tanto el material de control como las muestras de pacientes deben mantenerse bajo las mismas condiciones al ser analizados.

Algunas directrices para llevar a cabo este proceso son:

- a. El personal que realice estos análisis debe ser el que ejecutará el examen de rutina.
- b. Ubicar el material de control entre una serie de muestras analíticas en orden aleatorio, de modo que no quede ubicado en posiciones favorables, por ejemplo no siempre cercano a los estándares.
- c.- Analice el suero control una vez por día.
- d.- El proceso analítico debe ser documentado y comunicado al personal de modo tal que pueda ser utilizado en condiciones de rutina.
- e.- Con el propósito de evitar deterioro del material de control es conveniente alicuotarlo y almacenarlo congelado a -20°C .

Luego se realizan aproximadamente 20 análisis, se calcula la media, la desviación estándar y se ubican los resultados en la carta de control utilizado para la determinación de VCO.

La variación obtenida en condiciones de rutina en general, es el doble que la encontrada bajo condiciones óptimas para muchas técnicas colorimétricas. Esto se debe a las dificultades de mantener estables las condiciones analíticas durante un largo período en condiciones de rutina. Si existiese un desvío sistemático en los resultados, es importante controlar que esto no se deba al deterioro del material de control.

ETAPA IIIb

Variación de las condiciones de rutina: Valores desconocidos (VCRD).

Debido a las limitaciones de las etapas I y II es necesario aplicar la etapa III.

- 1.- Utilizar material de control de distintos niveles de concentración, dentro de rangos clínicos normales y esperados. En lo posible ojalá utilizar tres niveles de concentración.
- 2.- Asegurarse que los valores esperados sean desconocidos para el operador.
- 3.- Ubicar el material de control al azar en las series de análisis, en la misma forma en que se ubican los sueros de pacientes.

El material de control debe ser preparado por la persona responsable del control de calidad y entregado en manos del operador, sin encubrir estos sueros como si fueran muestras de pacientes para evitar que toda la serie reciba un tratamiento especial. Se calculan los mismos parámetros estadísticos mencionados en la etapa I y se grafica en la carta control.

PRECAUCIONES CON EL MATERIAL DE CONTROL

Una vez que se ha obtenido la variación en las condiciones de rutina con valores conocidos y desconocidos para el operador, es posible saber si la precisión es analíticamente satisfactoria en base a los resultados obtenidos al realizar los análisis bajo condiciones óptimas.

Si la variación es la misma, es obvio que las condiciones de rutina de la técnica son adecuadas con respecto al control trabajado bajo condiciones óptimas. Si son muy diferentes se debe realizar una investigación para conocer las causas.

En la mayoría de los métodos de rutina, debe aceptarse que las variaciones sean el doble que en condiciones óptimas y con frecuencia esto es irreducible.

También es interesante analizar las variaciones entre VCRC y VCDR, pues da cuenta de la capacidad del personal para no introducir sesgos.

Limitación de las técnicas en las etapas I y II

- La variación sólo se controla en una concentración del constituyente en estudio.
- El técnico que realiza el análisis diario se familiariza con los resultados obtenidos y puede subjetivamente introducir sesgos en la lectura de instrumentos.
- La técnica de la etapa I no evalúa cuan cerca está el resultado del valor real (exactitud).

Cuando un método se descontrola y existen dificultades para encontrar la explicación es útil volver a analizar el material de control bajo condiciones óptimas. Por esta razón es importante llevar registros respecto a estos estudios.

Causas de deterioro de la calidad

La causa de deterioro de la calidad más común es defecto de los reactivos. Con menor frecuencia los problemas se deben a fallas en instrumentos.

La falla de reactivos incluye: deterioro inesperado durante su utilización de rutina, errores en la preparación de reactivos, o pueden venir defectuosos de fábrica.

Usualmente estos problemas causan cambios en la exactitud de los resultados.

- Variaciones del proceso analítico (temperatura, tiempo, etc.) deben ser estrictamente controlada.
- Un cálculo mal hecho puede producir cambios de exactitud y precisión.
- Deterioro del material de calibración. Si se conoce su estabilidad y se consideran las fechas de vencimiento es poco probable que sea la causa de variación.
- Reconstitución inapropiada del material de control

ETAPA III

UTILIZACIÓN ESTADÍSTICA DE RESULTADOS DE LOS PACIENTES

Este método no es universalmente aceptado pues el tipo de paciente de los cuales el laboratorio recibe muestras, puede ser muy heterogéneo de un día a otro, sin embargo puede ser uno de los métodos que refleja correctamente los defectos de obtención, transporte, almacenamiento y manipulación a que están sujetos las muestras, (el material de control no atraviesa por este mismo proceso).

El método consiste en obtener un valor medio y el coeficiente de variación de un gran número de resultados de pacientes.

La variabilidad de la media de resultados obtenidos de un grupo de pacientes disminuye proporcionalmente a la raíz cuadrada de un número de determinaciones.

La variabilidad de la media estimada esta dada por el error estándar de la media

$$EEX = \text{error estándar de la media} = \sqrt{\frac{DE}{N}}$$

DE = desviación estándar de una población de pacientes

N = Número de mediciones de pacientes considerados para el cálculo del promedio.

Por ejemplo: Si	DE	N	EEX
	100	16	2,5
	100	25	2,0
	100	100	1,0
	100	400	0,5

A mayor número de determinaciones consideradas, menor error estándar de la media.

A menor desviación estándar, menor error estándar de la media.

Considerando un grupo de 100 mediciones, el error estándar de la media del grupo es aproximadamente igual a la variabilidad encontrada en observaciones individuales utilizando material de control estable y al aumentar 4 veces las observaciones (de 100 a 400 mediciones) el desvío de la media sólo se disminuye a la mitad.

Los cambios producidos en las medias de poblaciones de pacientes pueden ser causadas por múltiples variables: cambios demográficos, características de los pacientes (ra-

zón hombres/mujeres), razón pacientes hospitalizados/pacientes ambulatorios o a la presencia de muchos pacientes de una especialidad clínica, cambios en las condiciones preanalíticas como el tiempo en que se mantiene el torniquete, almacenamiento de los especímenes también pueden alterar la media de los resultados de una población y pueden ser monitoreados a través de este método.

Este método es útil para detectar errores sistemáticos, pero no tiene valor para detectar errores al azar. Puede ser usado como complemento de los métodos que utilizan material de control estable, pero jamás debe sustituirlo.

REGLAS MÚLTIPLES DE SHEWHART

Otro procedimiento utilizado para implementar los datos obtenidos al analizar material de control es una serie de reglas de control desarrolladas por Shewhart y colaboradores. La utilización de ellas disminuye al 0.01 la probabilidad de efectuar un falso rechazo de los datos y aumenta la probabilidad de detectar errores.

Este procedimiento utiliza las cartas de Levey-Jennings antes descrita, con las líneas dibujadas de límites de control.

Principio:

Primero debe estudiarse el método analítico para conocer sus características analíticas. Luego se realizan mediciones en material de control, el que debe ser estable y su concentración debe tener escasa variación en alícuotas y entre viales. De este modo mediciones repetidas nos otorgarán la imprecisión o errores aleatorios del método analítico. Se asume que la distribución de estos errores es gaussiana y que se le describe por la media (\bar{X}) y desviación estándar (DE). Estos estadígrafos se calculan por análisis efectuados en un período de 20 días, ejecutando una medición en cada material de control por corrida analítica y una corrida analítica por día.

Se puede utilizar material de control de un solo nivel de concentración, sin embargo es recomendable el uso de dos niveles de concentración con valores clínicamente útiles. Se introducen dos muestras de material de control en cada corrida analítica, una de cada concentración cuando se han seleccionado dos muestras de material de control. Se construye una carta control para cada material de control utilizado, registrando los valores y graficando en la respectiva carta control. En el eje Y se dispone la concentración observada, incluyendo un rango de concentración que considere hasta 4DE. Se dibujan líneas horizontales que representan la $\bar{X} + 1DE, \bar{X} - 1DE, \bar{X} + 2DE, \bar{X} - 2DE$.

$2DE, X - 2DE, X + 3DE, X - 3DE$. Se recomienda usar colores diferentes para dibujar estas líneas. En el eje X se ubica la escala de tiempo en días o números de corrida.

REGLAS DE CONTROL: Criterio para juzgar si las mediciones observadas están dentro o fuera de control.

REGLAS DE CONTROL DE SHEWHART

REGLA	DEFINICIÓN	SENSIBILIDAD
1_2DE	1 Valor de control fuera de $\bar{X} \pm 2DE$	Aleatorio y sistemático
1_3DE	1 Valor de control fuera de $\bar{X} \pm 3DE$	Aleatorio y sistemático
2_1DE	2 Observaciones de controles consecutivos excediendo $\bar{X} \pm 1DE$	Sistemático
4_1DE	4 Observaciones de controles consecutivos excediendo $\bar{X} \pm 1DE$	Sistemático y aleatorio
$10X$	10 Observaciones valores de controles consecutivos a un lado de la medida	Sistemático

1.- Una observación de control excede la media + 2DE o la media - 2DE. Se usa como regla de alerta, significa que se requiere mayor inspección de los datos de control usando las reglas que siguen para juzgar si la corrida analítica debe aceptarse o rechazarse.

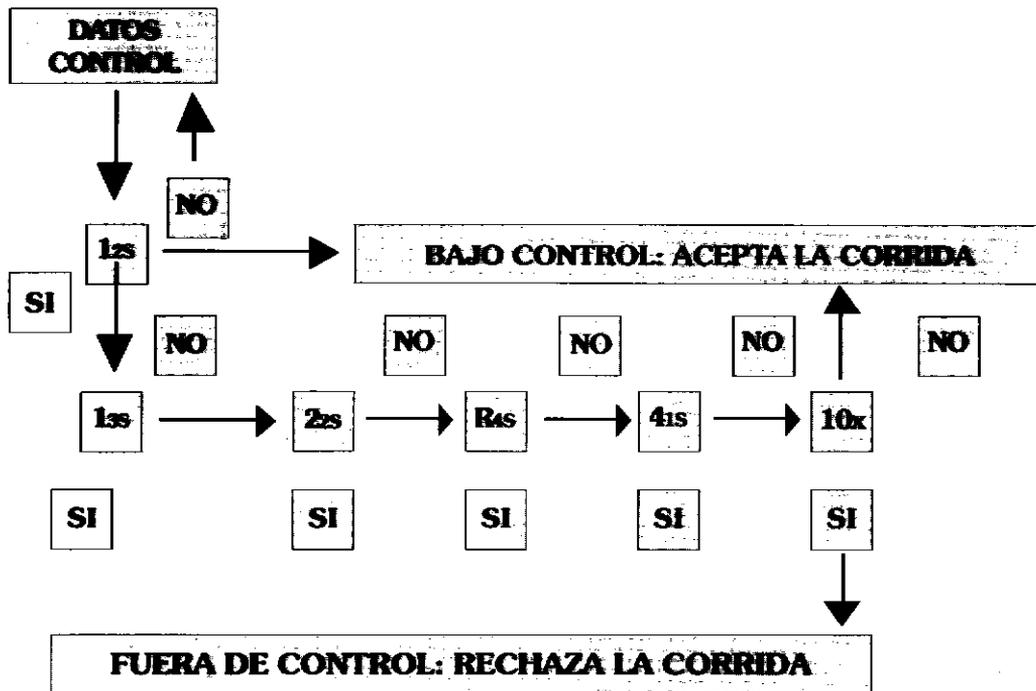
2.- Una observación del control excede la media +3DE o la media -3DE es una regla que rechaza la observación. Es sensible a errores aleatorios.

3.- Dos observaciones consecutivas de control que exceden los límites de la media +1DE o la media -1DE dentro de una corrida analítica o una observación. Es una regla de rechazo, sensible a errores sistemáticos.

4.- Cuatro observaciones consecutivas exceden la media +1DE o la media -1DE considerando 10 corridas de un suero control o 5 corridas analíticas consecutivas considerando dos sueros controles.

5.- Diez observaciones consecutivas caen a un lado de la media (sobre o bajo, sin considerar la X magnitud de la desviación). Es una regla de rechazo sensible a errores sistemáticos.

REGLAS DE CONTROL DE SHEWHART



INTERPRETACIÓN DE DATOS OBSERVADOS EN LAS CARTAS DE CONTROL

Cuando las observaciones de ambos controles caen dentro de los límites 2DE, se acepta la corrida analítica y se informan los resultados de los pacientes. Cuando la observación de un control excede los límites de 2DE, retenga los informes de pacientes e inspeccione los datos de control usando las reglas antes descritas si se transgrede cualquiera de las reglas indica que la corrida esta fuera de control rehace la corrida analítica y no informe las muestras de los pacientes. Cuando no se transgrede ninguna corrida esta bajo control, acepte la corrida analítica e informe los resultados de los pacientes.

Cuando la corrida esta fuera de control, determine el tipo de error que se produjo basándose en la regla de control que fue transgredida. Investigue las posibles fuentes de ese tipo de error, corrija el problema y luego vuelva analizar toda la corrida incluyendo: calibradores, controles y muestras de pacientes.

CONTROL CUSUM

Este método permite ver fácilmente la precisión de la técnica que se está controlando y es especialmente útil para detectar cambios en los resultados debidos a una tendencia, ya sea por deterioro de los reactivos o por descalibración del equipo.

El CUSUM se puede representar por medio de una carta control en papel milimetrado o de una tabla.

I. Carta Control CUSUM

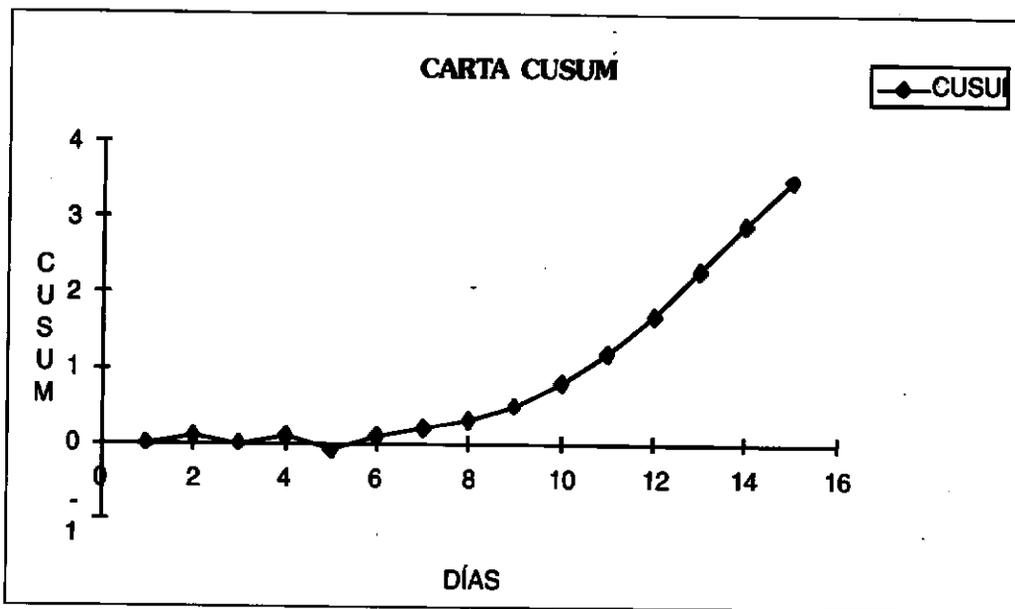
Igual que en la carta control tradicional se tiene una serie de 20 mediciones a partir de las cuales se determina la media (\bar{x}) y la desviación estándar (D.E.), pero, en este caso, los valores que se grafican corresponden a la diferencia entre el resultado obtenido con el material de control y la media, conservando, cada vez, el signo algebraico, lo que permite tener diariamente la suma algebraica en relación a los días anteriores; de ahí proviene el nombre CUSUM que es una sigla en inglés que corresponde a la «suma acumulativa» (cumulative sum) de las diferencias.

Para explicarlo mejor veremos un ejemplo en que la media de los valores fue 14,4 g/dl y la desviación estándar 0,33 g/dl.

DÍA	Hb G/DL	DIFERENCIA	CUSUM
1	14,4	0	0
2	14,5	+0,1	+0,1
3	14,3	-0,1	0
4	14,5	+0,1	+0,1
5	14,2	-0,2	-0,1
6	14,6	+0,2	+0,1
7	14,5	+0,1	+0,2
8	14,5	+0,1	+0,3
9	14,6	+0,2	+0,5
10	14,7	+0,3	+0,8
11	14,8	+0,4	+1,2
12	14,9	+0,5	+1,7
13	15,0	+0,6	+2,3
14	15,0	+0,6	+2,9
15	15,0	+0,6	+3,5

Como se ve claramente en la tabla anterior, la diferencia obtenida cada día se sumó algebraicamente al resultado CUSUM del día anterior.

Así cuando un método está bajo control, la representación gráfica de CUSUM tiende a ser una línea horizontal en 0.



II. Tabla CUSUM.

Igual que para la carta control anterior se debe conocer la \bar{x} y D.E. de un mínimo de 20 determinaciones y luego se debe proceder a:

- Decidir el valor del cambio mínimo significativo a ser considerado = $d = 2 \text{ D.E.}$
- Calcular $k = \text{D.E.}$
- Calcular el valor de referencia superior (VRS) = $\bar{x} + k$
- Calcular el valor de referencia inferior (VRI) = $\bar{x} - k$
- Calcular el intervalo de decisión = $2k$

Método de registro del CUSUM en tabla

1. Llevar el CUSUM a cero
2. No partir el CUSUM si el valor del control yace entre VRS y VRI
3. Partir con el gráfico si el valor del control sale fuera de los límites dados por VRS y VRI. El CUSUM ahora es igual a la diferencia entre el valor del control y el correspondiente valor de referencia (VR), así será: $x - VRS$ o $VRI - x$
4. A esta diferencia agregar la próxima diferencia CUSUM y continuar agregando la diferencia entre el valor control y el mismo valor de referencia aún cuando el valor caiga dentro de los límites establecidos por los VR o fuera del VR opuesto.
5. Si el signo del CUSUM cambia, pero el valor no está fuera del valor opuesto, entonces llevar a cero y partir un nuevo CUSUM.
6. Si el signo del CUSUM cambia y el valor está fuera del VR opuesto, esto indica un brusco cambio en la calibración.
7. Si el CUSUM iguala o excede el intervalo de decisión, esto sugiere un cambio significativo en la exactitud, entonces controlar la calibración y corregirla. Llevar el CUSUM a cero y partir un nuevo CUSUM.

Utilizando los mismos datos de la carta CUSUM anterior se obtienen los siguientes resultados:

$$\begin{aligned}d &= 2 \text{ D.E.} = 0,66 \text{ g/dl} \\x &= 14,46 \text{ g/dl} \\k &= \text{D.E.} = 0,33 \text{ g/dl} \\VRS &= 14,79 \text{ g/dl} \\VRI &= 14,13 \text{ g/dl} \\ \text{Intervalo de} &= 0,66 \text{ g/dl} \\ \text{decisión} &\end{aligned}$$

Si estos valores los aplicamos a la tabla se observa que durante los 10 primeros días los

resultados caen dentro de los límites establecidos por VRS (14,79 g/dl) y VRI (14,13 g/dl). En el día 11 se llega al límite superior de alerta y se tiene el CUSUM en 0, lo que indica que se debe iniciar el gráfico; en este caso la tabla con las diferencias queda así:

DÍA	HB G/DL	DIFERENCIA	CUSUM
11	14,8	0	0
12	14,9	+0,1	+0,1
13	15,0	+0,2	+0,3
14	15,0	+0,2	+0,5
15	15,0	+0,2	+0,7

Como el intervalo de decisión, en este caso, es de 0,66 g/dl, se tiene que el día 15 se ha sobrepasado este límite y es necesario controlar la estandarización de la técnica, empezando por la calibración del equipo.

En el mundo existen diversos esquemas de evaluación interlaboratorio, los que difieren en cuanto a:

- El organismo que organiza el esquema: (instituciones gubernamentales, sociedades científicas, organismos privados, etc.).
- Si los resultados son utilizados por agencias que acreditan a los laboratorios: los utilizan para fiscalizarlos o para ejercer una labor educativa.
- Si la participación es anónima o no lo es.
- Si la participación es voluntaria u obligatoria.
- Difieren además en el número de laboratorio que participan.
- En el número y tipo de constituyentes que evalúan.
- La frecuencia de las distribuciones.

ETAPA IV

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO: VER CAPITULO XII.

BIBLIOGRAFÍA

General Requirements for the competence of calibration and testing Laboratories. ISO Guide 25, 3rd edition, 1990.

Mejoría Continua de la Calidad. Guía para los Laboratorios Clínicos de América Latina, Ed. Español: ML Castillo, ME Fonseca, en colaboración con COLABIOCLI. Editorial Medica Panamericana, 1995.

Whitehead, T.P. Principles of Quality Control, WHO Lab/76.1.

Hill, P., Uldall, A., Wilding, P. Fundamentals for External Quality Assessment(EQA), IFCC, 1993.

Garantía de Calidad en el Labotario Clínico. Hipolito Niño, Luis Becerra, Editorial Panamericana, 1ª edición, 1993.

MINSAL Reglamento de Laboratorios Clínicos DS N°433, Santiago, 1993.

Normas Técnico-Administrativas Laboratorio Clínico (en prensa), 1996.

Estructura para un Manual de Calidad de Laboratorio Clínico, Adam Uldall y cols, Informe Provisional del Proyecto NORDKEM para información comentarios y discusión.

Capítulo XII

**PROGRAMAS DE EVALUACIÓN
EXTERNA DE CALIDAD**

Liliana Urra Molina

PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD (PEEC)

INTRODUCCIÓN

En el laboratorio clínico el producto final son los resultados de los exámenes que en él se procesan y este producto debe obligatoriamente ser sometido a un estricto Control de Calidad Interno (CCI). Por otra parte, el laboratorio también debe someterse a un Control de Calidad Externo (CCE) en el cual el laboratorio participa, junto a otros laboratorios, de programas conjuntos que les permite comparar sus resultados y metodologías.

Los programas de evaluación externa de la calidad (PEEC), promueven la calidad analítica entre los laboratorios clínicos, ayudando a identificar errores y estimular un mejor desempeño de los participantes. Además proporciona información relevante respecto a métodos analíticos, instrumentos y reactivo de diagnóstico, todo lo cual es útil tanto para los organizadores como para los usuarios del sistema, al permitirles a los primeros conocer la situación nacional de los laboratorios y a los segundos comparar sus resultados con los demás laboratorios que utilizan métodos y condiciones similares.

Para contribuir a mejorar la confiabilidad de los resultados de los laboratorios clínicos, se han desarrollado programas de evaluación externa en la mayoría de los países. Estos programas están a cargo de organismos oficiales, sociedades científicas o grupo de profesionales, y han contribuido a que los exámenes sean más homogéneos y comparables entre los laboratorios adscritos a estos programas.

El Instituto de Salud Pública (ISP) organiza los PECC en nuestro país. Hasta la fecha ha desarrollado evaluaciones interlaboratorios en las disciplinas del laboratorio clínico: Química Clínica, Bacteriología, Hematología, Parasitología, Micobacterias, Inmunología, Serología de Sífilis y Virología. Su objetivo final es contribuir a mejorar la calidad de los exámenes.

METODOLOGÍA

El Control de Calidad Interno y el Control de la Calidad Externo tienen funciones que se complementan. El primero sirve para verificar la precisión de los resultados de los exámenes mientras que el segundo permite la concordancia entre los laboratorios.

Los esquemas del Control de la Calidad Externo pueden ser nacionales, regionales o locales. Todos tienen ventajas y desventajas. En un esquema regional o local se tiene recepción rápida de los resultados con un contacto fácil entre el laboratorio evaluado y el laboratorio participante para discutir los problemas que pueden aparecer. En un esquema nacional se obtiene un banco de datos mayor que permite tener una estadística más confiable, en especial cuando se usan métodos e instrumentos distintos para un mismo análisis.

Los principios del PEEC son los mismos en todas las especialidades de laboratorio; sin embargo los métodos pueden ser diferentes, como por ejemplo, el control de paneles de sueros, previamente analizados, que un laboratorio envía al Laboratorio de Referencia para comprobar sus resultados, o bien, paneles de sueros preparados por el Laboratorio de Referencia y enviados para su análisis a los laboratorios periféricos. Una limitación importante es lo costoso de la preparación de tales paneles en condiciones de seguridad y estabilidad. El Laboratorio de Referencia prepara sueros de control garantizando la homogeneidad de sus alícuotas y la estabilidad de las muestras que son enviadas a los laboratorios participantes. Los laboratorios deben analizar, junto a sus muestras de rutina, estos sueros según instrucciones.

Los sueros enviados pueden incluir, dos muestras idénticas, si se quiere evaluar la reproducibilidad. También se emplea el sistema de envío de láminas ya sea del laboratorio de Referencia a los laboratorios y/o viceversa para confrontar los resultados obtenidos, el sistema de envío de cepas bacterianas y el envío al Laboratorio de Referencia de medios de cultivos preparados localmente por los laboratorios.

OBJETIVOS DEL PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD

Los objetivos del PEEC son:

- Supervisar la tecnología de los laboratorios
- Identificar problemas
- Evaluar destreza de la tecnología
- Obtener concordancia interlaboratorios
- Educar y capacitar
- Dar confianza al usuario
- Identificar comportamiento de especificaciones de los kits reactivos.

Para el buen funcionamiento del PEEC se debe considerar las siguientes especificaciones:

- 1.- Frecuencia: a lo menos 2 veces al año dependiendo de la importancia clínica y de las confiabilidad de los métodos empleados.
- 2.- Muestras: dos o más para cada examen y deben elegirse en niveles diagnósticos críticos.
- 3.- Realismo: las muestras deben simular muestras clínicas reales.
- 4.- Estabilidad: las muestras deben ser estables, al menos hasta la fecha tope de respuesta.
- 5.- Tiempo de respuesta: las muestras deben procesarse y los resultados enviados dentro del plazo estipulado para cada evaluación y los informes a los participantes deben hacerse lo antes posible para que puedan detectar sus errores.
- 6.- Confidencialidad: se debe respetar la confidencialidad evaluador/participante.

Principios básicos esenciales del PEEC incluyen:

- 1.- El PEEC debe estar bajo la responsabilidad de profesionales de laboratorio.
- 2.- El PEEC no debe ser una autoridad que de licencia ni un cuerpo policial, su función primordial es de educación y capacitación.

En el mundo existen diversos esquemas de evaluación interlaboratorios.

MATERIAL DE CONTROL ENVIADO

El material de control debe ser homogéneo y estable y debe distribuirse en cantidades suficientes para analizar todos los constituyentes, pero no en exceso para evitar repeticiones y tratamiento especial.

Se debe adjuntar un instructivo para señalar el origen o tipo de material de control y sus características, así como la forma de reconstituirlo cuando se trata de material liofilizado. Se debe entregar a todos la dirección a la que deben enviar los resultados, y la última fecha en la cual se aceptaran las respuestas para ser incluidas en el análisis estadístico. Se debe enviar además la hoja de respuesta que indica la forma en que deben informar los resultados.

Dependiendo de lo que se quiere evaluar, se pueden enviar soluciones líquidas estabilizadas o material liofilizado (Ej.: evaluaciones de constituyentes urinarios y séricos en el área de Química Clínica).

CARACTERÍSTICAS DEL ESQUEMA DE EVALUACIÓN INTERLABORATORIO QUE REALIZA EL INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE (PEEC)

El actual esquema de evaluaciones interlaboratorio organizado por el Instituto de Salud Pública de Chile tiene las siguientes características:

- Deben participar todos los laboratorios del país.
- Tiene carácter anónimo.
- Actualmente el Programa de Evaluación Externa de la Calidad de los laboratorios clínicos consta de 8 subprogramas. Química Clínica, Hematología, Parasitología, Serología de Sífilis, Bacteriología, Virología, Inmunología y Micobacterias.
- El propósito del programa es proporcionar un servicio a los laboratorios para su propia información y la de los usuarios y tiene un rol educativo.
- El número de laboratorios participantes en las distintas áreas del laboratorio clínico es variable al igual que el número de distribuciones anuales.
- La mayoría de los laboratorios de Referencia envían a los laboratorios clínicos el mismo material de control, sin embargo otros solicitan a los laboratorios que sean ellos los que manden el material al Laboratorio de Referencia. (Ej.: micobacterias).

OBJETIVOS DE CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Los resultados de los análisis de un laboratorio se comparan con los de los otros laboratorios que analizan el mismo material usando el mismo método u otro.

- a) De este modo se mide la habilidad de los distintos laboratorios para obtener el mismo resultado al analizar idénticos especímenes.

- b) En esta etapa se pueden evaluar el éxito o fracaso de las primeras etapas de calidad del control. Si a través del programa de control de calidad externo se detecta que el laboratorio tiene resultados insatisfactorios y aún los sistemas de control de calidad interno indican que la calidad de trabajo es satisfactorio, indica que los sistemas de control de calidad interno no son adecuados.
- c) Por otro lado si se conoce el valor verdadero de los constituyentes de los especímenes los resultados pueden dar una idea de la exactitud.
- d) Los resultados de los análisis obtenidos por los laboratorios participantes son útiles para obtener el valor de consenso general y por método, de los constituyentes evaluados en el espécimen cuyo valor verdadero no se conoce.
- e) Los resultados obtenidos de las evaluaciones externas tanto para instrumentos como constituyentes son útiles para detectar los laboratorios que producen resultados insatisfactorios.

De este modo la institución organizadora puede proporcionar asesoría a través de supervisiones directas (visitas) o indirectas (envío de información y material de control) y capacitación a profesionales de laboratorios clínicos.

EVALUACIÓN DE RESULTADOS

El propósito de esta etapa es obtener información en relación al desempeño de los laboratorios en forma individual y agrupando a los laboratorio de acuerdo al método empleado para cuantificar un determinado constituyente. Básicamente se requieren dos tipos de cálculos:

- 1.- La diferencia entre un resultado individual y el valor de consenso para ese espécimen y su relación con el desempeño estándar (DRP, DRPA)
- 2.- Una medida de la dispersión de los resultados agrupados (coeficiente de variación por método y desviación estándar).

El valor de consenso general se obtiene en nuestro esquema mediante el cálculo del promedio de todos los resultados una vez removidos los valores aberrantes.

El valor de consenso por método se obtiene agrupando a todos los laboratorios que utilizan un método particular, después de excluir valores aberrantes.

Los valores aberrantes; son valores discordantes, no representativos de la mayoría de los resultados y se producen por errores de cálculo, cambios en la posición del decimal, errores groseros en la determinación analítica entre otros.

Al excluir los valores aberrantes, los resultados reflejan más adecuadamente el desempeño analítico normal.

Existen varios métodos para excluir valores aberrantes (excluir aquellos valores que caen fuera del $\bar{X} \pm 3DS$; utilizar el método de Healy; y el de percentiles); nuestro esquema utiliza el primer método.

CALCULOS ESTADÍSTICOS

MEDIDAS DE DISPERSIÓN

1.- DESVÍO ESTÁNDAR

Informa respecto a la variación de los resultados analíticos, es uno de los mejores métodos para describir la distribución de un conjunto de resultados en forma cuantitativa. Se calcula por medio de la determinación de la media de un conjunto de resultados (\bar{X}), calculando cómo cada resultado (X) varía a partir de esa media ($X - \bar{X}$) y elevando al cuadrado la diferencia $(X - \bar{X})^2$.

Se calcula luego la suma de todas las diferencias elevadas al cuadrado ($\sum(X - \bar{X})^2$). Esto se divide por el número de resultados (n) menos uno ($n - 1$). La raíz cuadrada de la cifra resultante es el desvío estándar.

$$DE = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

2.- COEFICIENTE DE VARIACIÓN

El coeficiente de variación es el desvío estándar calculado como porcentaje del valor medio.

$$CV = \frac{DE}{\bar{X}} \times 100$$

Cuanto mayor es el desvío estándar de un conjunto de resultados más pobre es la precisión del método.

El Instituto de Salud Pública participa en controles externos realizados por:

- Universidad Ziekenhis St Rafael; Bélgica.
- Centro Asesor OMS; Clinical Chemistry Department; Queen Elizabeth Hospital; Birmingham; Reino Unido.
- Center for Disease Control (CDC), Atlanta. Estados Unidos.
- Sistema Control de Calidad Externo del Reino Unido (UKNEQAS).
- Laboratory Centre for Disease Control, (LCDC) Ottawa, Canada..
- Diagnóstico Directo Laboratorio de Control de Calidad, OMS
- Departamento de Enfermedades Parasitarias Tropicales; Grupo Hospitalario Petié Salpetrière; Paris ; Francia.
- Instituto Nacional de Serología de Chagas Dr. Mario Fatała Chaven; Buenos Aires; Argentina.
- Royal Post-Graduate Medical School; Reino Unido.
- Gonococcal Antimicrobial Surveillance Program WHO/PAHO Ottawa - Canada .

Capítulo XIII

INFORMES DE RESULTADOS

Judith Mora Riquelme, Aurora Maldonado Ballesterro

INFORMES DE RESULTADOS

La garantía de calidad se implementa por medio de la ejecución de un conjunto de actividades entre las cuales se deben considerar los procedimientos utilizados en la elaboración de protocolos e informes de resultados.

Los resultados emitidos por los laboratorios son cruciales no sólo para los pacientes individuales sino para la administración general de la salud pública, la vigilancia epidemiológica, la evaluación de la efectividad en la prevención de enfermedades y el curso de las campañas de control. A veces ocurren inexactitudes o interpretaciones erradas de los resultados del laboratorio, llevando a diagnósticos y tratamientos equivocados de los pacientes. Por ejemplo un «falso positivo», que afirma que una persona tiene infección por HIV, tiene un impacto devastador en el paciente o puede significar instaurar una terapia inadecuada. Por otro lado un resultado «falso negativo» puede significar el uso de sangre inadecuada para transfundir, impedir que se aplique al paciente un tratamiento rápido ó que por desconocimiento transmita una infección a otros individuos.

GUÍA ÓPTIMA PARA ENTREGA DE RESULTADO

TIPO MUESTRA	INFORME PRELIMINAR	CULTIVO NEGATIVO	CULTIVO POSITIVO	OBSERVACIONES
ESPUTO	1 hora: Gram 4 horas: Muestra inadecuada	48 hrs.	48-72 hrs.	
FARINGEA		24 hrs	24-48 hrs.	
ASPIRADOS, ABSCESOS	1 hora: Gram	48 hrs.	48-72 hrs.	Cultivo anaerobio: Más tiempo
SECRECIONES OTICA, OCULAR	1 hora: Gram	48 hrs.	48-72 hrs.	
SECRECIONES URETRALES, CERVICALES, VAGINALES	1 hora: Gram y directo	48 hrs.	48-72 hrs.	Patógenos específicos y otras técnicas: Más tiempo.
ORINA	1 hora: Gram y sedimento	24 hrs.	48 hrs.	
DEPOSICIONES		48 hrs.	72 hrs.	
BIOPSIA, LIQUIDO PLEURAL, OTRAS MUESTRAS ESTERILES	1 hora: Gram 24 hrs: Informe preliminar negativo	7 días	24 hrs. después del aislamiento	
HEMOCULTIVOS	24 hrs.: Informe preliminar	7 días	24 hrs después del aislamiento	

Pauta de Informe de Resultados

El formato del informe es la única manera visible de presentar el trabajo total del laboratorio, por lo que es muy importante el diseño que se elabore.

Sus características principales deben ser:

1. Solidez del informe. El informe debe ser compacto, contener de una sola manera la información pertinente. Debe ser claro y fácil de leer. Un sistema útil es diferenciar los diferentes procedimientos con colores y así se pueden añadir varios de estos informes con la historia del paciente, de tal manera que aparezca en el borde inferior la identificación del examen. En caso de existir registro computarizado se recomienda informar solo los resultados de los análisis solicitados.
2. Uniformidad en las unidades y abreviaturas: las unidades deben ser siempre las mismas para cada examen y determinar cual es la mejor expresión para cada parámetro. Ej: en la adopción del sistema internacional de unidades (S.I.)

<u>Unidad</u>	<u>abreviatura ecomendada</u>	<u>Abreviatura confusa, incorr ecta.</u>
Gramo (s)	g	GM, Gm, G, gramo, Gramo, gm, gms

Los resultados deben expresarse en un número de 2 a 3 dígitos, Por ejemplo en vez de 0,80 nanogramos /ml, es mejor escribir 800 ng/l.

Empleo solo de números significativos: Como regla general, mientras sea posible no se entregarán resultados con decimales. Existe la probabilidad que una mancha o el olvido de un punto decimal den la impresión de un valor 10 veces más alto, estas confusiones pueden ser extremadamente peligrosas en análisis tales como nitrógeno ureico, creatinina, glucosa y bilirrubina. En caso de requerir resultados con decimal (Calcio por ejemplo), entregarlos solo con un decimal.

3. Claridad: Un supervisor debe analizar la escritura, especialmente los números de todo el personal e instruirlos para que escriban claro. Se deben corregir problemas como escribir el 2 y el 7 casi idénticamente, ó un 1 similar a una coma. Es imprescindible que el informe final no presente evidencias de haber sido alterado o corregido, ya que éste perdería credibilidad ante el médico. En caso de correcciones el informe debe escribirse nuevamente.

El informe debe incluir:

- Identificación completa (Nombre, dirección, teléfono) del Laboratorio emisor.
- Identificación Paciente (Nombre completo o clave asignada).
- Sexo, edad o fecha de nacimiento, valores de referencia para ciertos parámetros.
- Procedencia de la muestra.
- Médico o entidad solicitante (si procede).
- Dirección de envío (si procede)
- Fecha de toma de muestra. Algunos casos requieren hora de toma de muestra (Como en los estudios seriados, estudios de niveles plasmáticos de drogas).
- Número de muestras analizadas.
- Tipo de muestra analizada.
- Condiciones del paciente (en ayuno, postprandial, etc).
- Resultados.
- Indicar los métodos con que se ha analizado la muestra y junto a los resultados, valores de referencia, nombre científico completo del agente identificado.
- Observaciones.
- Nombre y firma del profesional responsable.
- Fecha de resultado.

4. Registro de datos del paciente y resultados (Libro de Resultados interno)

Siempre deberá documentarse por el período que estipule la ley:

- Nombre y apellido del paciente.
- RUT.
- Edad.
- Procedencia.
- Fecha de toma de muestra.
- Si la muestra fue tomada en el laboratorio o remitida.
- Documentar si el análisis fue realizado en el laboratorio o referido.
- Resultados de exámenes.
- Técnicas de laboratorio utilizadas.

5. Entrega de Informe de Resultados:

Establecer un protocolo general de entrega de resultados:

- a. Fecha de entrega.
- b. Lugar y vía de despacho (personal, correo ordinario, fax, etc.)
- c. Establecer un libro de registro de la fecha de despacho, vía, identificación de la persona que lo retira.

BIBLIOGRAFÍA

Gómez Carrillo M. Mora J., Russi JC. OPS/OMS. Garantía de Calidad en el Diagnóstico Serológico de la infección por Virus de la Inmunodeficiencia Humana. Publicación N° 42 Argentina, 1995.

Cura E. Wendel S. OPS. Manual de Procedimientos de Control de Calidad para los Laboratorios de Serología de los Bancos de Sangre. 04.21, Washington D.C. PAHO/HPC/HCR, 1994

Capítulo XIV

VALORES DE REFERENCIA

Darwins Castillo Alvarez

VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia son una parte del programa de garantía de calidad de un laboratorio. Estos valores son tan importantes como el resultado obtenido para el paciente. Por tanto, un laboratorio debiera determinar y disponer de los valores de referencia de todas las determinaciones que realiza.

Los valores de referencia se utilizan para evaluar el estado de salud individual o de poblaciones, identificar individuos con riesgo de enfermar, ayudar en decisiones clínicas y en investigaciones científicas.

Actualmente, el concepto de valor de referencia no sólo abarca a los valores de individuos sanos, sino también de individuos que corresponden a grupos clínicos relevantes como: pacientes con una enfermedad específica (ejemplo: valores de referencia en diabéticos), población de alto riesgo (ejemplo: valores de referencia para individuos con alto riesgo para enfermedades coronarias), pacientes expuestos a un cierto tratamiento, etc.

Los valores de referencia de la mayoría de los analitos del suero humano u otro líquido biológico varían con la edad, sexo, raza, diferencia genética, factores ambientales y socio-económicos.

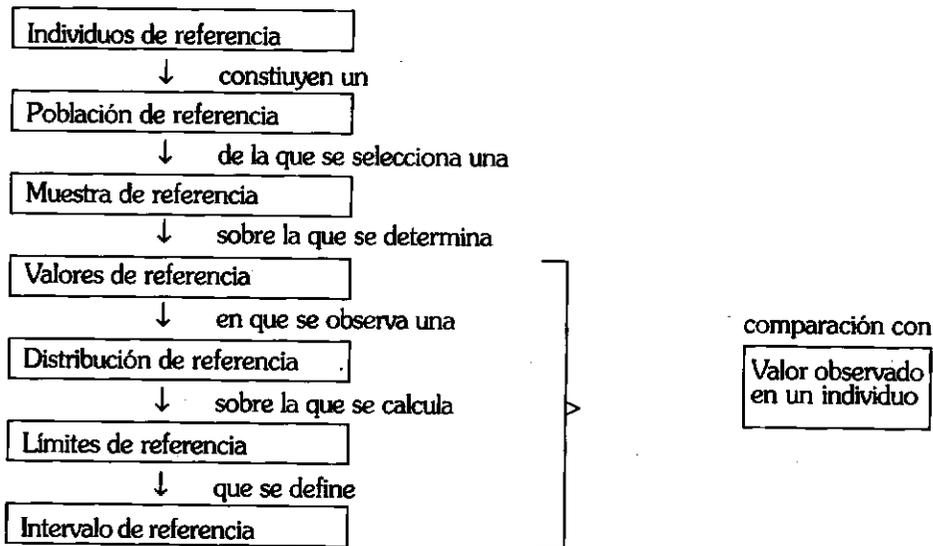
Un análisis comprensivo de este tema requiere necesariamente definiciones de algunos conceptos:

- **Individuo de referencia:** es un individuo seleccionado para estudios de comparación usando criterios muy definidos que especifican el estado de salud, enfermedad u otra condición relevante.
- **Población de referencia:** incluye a todos los posibles individuos de referencia.
- **Muestra de referencia:** es un número adecuado y al azar de individuos de referencia que representan a la población de referencia.
- **Valor de referencia:** es el valor obtenido por observación o medición de un analito o parámetro en individuos de referencia.

- **Distribución de referencia:** es la distribución estadística de los valores de referencia.
- **Límite de referencia:** es derivado de la distribución de referencia y es usado para propósitos descriptivos. En forma simple, se define como la fracción establecida de los valores de referencia que debieran ser menor o igual a un límite con una probabilidad establecida.
- **Intervalo de referencia:** es el intervalo entre dos límites de referencia e incluye esos límites.
- **Valor observado:** es un valor de un analito o parámetro en particular, obtenido por observación o medición e informado con el propósito de tomar una decisión médica. Puede ser comparado con valores de referencia.

Los conceptos definidos anteriormente se interrelacionan y pueden observarse en el siguiente esquema (Tabla 1).

Tabla 1.- Flujograma de los conceptos de valores de referencia:



TIPOS DE VALORES DE REFERENCIA

Los valores de referencia pueden ser clasificados en: valores basados en una población o valores basados en un individuo y pueden ser univariantes o multivariantes y tiempo-específico o tiempo-no específico.

Valores de referencia basados en una población son los valores a los que nos vamos a referir y nos permiten la comparación con valores individuales.

Valores de referencia basados en un individuo, son valores previos de un mismo individuo, obtenido en un estado definido de salud y son válidos para la comparación sólo en ese individuo.

Valores de referencia multivariantes corresponden a resultados de dos o más tipos de parámetros obtenidos en la misma subpoblación de referencia

Valores de referencia tiempo-específico son obtenidos en tiempos definidos en relación al ritmo biológico.

OBTENCIÓN DE VALORES DE REFERENCIA

Los procedimientos para la obtención de valores de referencia deben ser dependiente del tipo de analito o parámetro a medir y debe considerar la fuente y magnitud de variaciones no patológicas, localización y dispersión de otros valores de referencia y la relación costo beneficio clínica-laboratorio.

Los valores de referencia son sólo significativos cuando los individuos y métodos están correctamente descritos y los siguientes factores son adecuadamente establecidos:

- a) Criterios de inclusión y exclusión para definir la población de referencia.

Criterios de inclusión define características de los individuos que pueden entrar en la muestra de individuos de referencia, por ejemplo, individuos sanos, pacientes con una enfermedad específica, etc. El estado de salud "sano", de acuerdo a la OMS "es un estado completo de bienestar físico, mental y social y no solamente ausencia de enfer-

medad". Sin embargo, la palabra sano es conceptualmente diferente en distintos países, en el mismo país a través del tiempo y en el mismo individuo en diferentes edades. Por tanto, el estado de salud sano es un estado relativo y no absoluto.

Criterios de exclusión corresponden a características prohibidas. Es generalmente difícil especificar criterios adecuados, por ejemplo para salud. Sin embargo, deben considerarse estados fisiopatológicos, consumo de agentes farmacológicamente activos, estados fisiológicos modificados (ejemplo: embarazo).

- b) Criterios de partición se usan para caracterizar subpoblaciones de la población de referencia como edad, sexo, grupo étnico, factores genéticos y socio-económicos.
- c) Condiciones fisiológicas y ambientales en que se estudia la población de referencia y condiciones en que la muestra se obtiene. Por ejemplo: consumo de alimentos y medicamentos de la población, características de fumador o no fumador, grado de obesidad, embarazo o etapa ciclo menstrual, saneamiento, tiempo y fecha de obtención de la muestra.
- d) Procedimiento de obtención de la muestra, que incluye preparación del individuo, vía de extracción, manejo y almacenamiento.
- e) Método analítico que se utiliza, que incluye el conocimiento de la sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud.
- f) Método estadístico para la estimación de los límites de referencia.

Selección de individuos de referencia

La selección de individuos de referencia puede realizarse por:

- selección retrospectiva de individuos de una población de referencia obtenida al azar o no, siguiendo los criterios de partición o exclusión, que considera características de la muestra de referencia.
- selección prospectiva de individuos de una población general usando criterios establecidos de exclusión y partición, determinados por estudios previos sobre la misma población u obtenido de la literatura.



La selección retrospectiva es ideal para el estudio de criterios de exclusión y partición de grandes grupos de muestras. Por ejemplo, elementos principales de la población general: medio rural y urbano, grupo étnico, nivel socio-económico. Se utiliza para obtener valores de referencia de individuos sanos.

La selección prospectiva es más conveniente, pero requiere conocer previamente los criterios de partición y exclusión. Puede utilizarse para obtener valores de referencia en todas las situaciones.

Los criterios de partición debieran limitarse a valores de referencia que exhiben diferencias significativas o una alta dispersión en sub-grupos de referencia. Por ejemplo, una subclasificación con la edad debe realizarse en la determinación de valores de referencia de inmunoglobulinas y en mediciones funcionales de inmunidad celular, subclasificación con la edad y sexo debe realizarse en la búsqueda de valores normales de S-creatinina.

Preparación de los individuos de referencia y obtención de la muestra

La preparación del individuo, recolección y manejo de la muestra deben seguir los mismos procedimientos que se aplican a una muestra regular de la práctica médica.

La estandarización de estos factores preanalíticos puede eliminar o minimizar los sesgos o variaciones que pueden interferir con los cambios asociados a enfermedad, riesgo o tratamiento.

Control de variaciones analíticas y transferencia de los valores de referencia

La obtención y definición de los valores de referencia involucran la descripción de los métodos analíticos, reactivos, instrumentos, procedimientos de calibración, programas de control de calidad de un laboratorio, informes y resultados. Todos estos aspectos ya han sido revisados cuidadosamente en éste manual y deben ser considerados en el control para la obtención de los valores de referencia.

Es recomendable que durante la obtención de valores de referencia se apliquen rutinariamente los programas de control de calidad externos e internos y exista una concordancia con los errores analíticos permitidos.

La obtención de valores de referencia consumen mucho tiempo y el costo es excesivo, lo que hace imposible lograrlo en laboratorios pequeños y medianos. También, factores éticos limitan el número de individuos de referencia (por ejemplo, valores de referencia pediátricos), por lo tanto, es recomendable que varios centros colaboren para la obtención de valores de referencia y posteriormente todos utilicen los mismos.

A nivel nacional es posible que los laboratorios de referencia, en colaboración con laboratorios locales, puedan organizar, coordinar y estructurar la obtención de algunos valores de referencia.

Tratamiento estadístico y determinación de límites de referencia

En este punto se indicarán algunas consideraciones generales del tratamiento estadístico y la determinación de los límites de referencia, sin embargo, para una mayor información y profundización se recomienda revisar literatura específica.

Existen dos métodos para la estimación de un intervalo de referencia: paramétricos y no paramétricos. Ambos tienen igual grado de precisión.

Se han propuesto varios tipos de intervalos de referencia: fractil, también llamado percentil, de tolerancia y de predicción. Los intervalos de referencia definidos por fractiles son los regularmente utilizados y son estimados por métodos paramétricos como no paramétricos.

El método no paramétrico o distribución libre no hace presunción acerca de la forma de la distribución. Se realiza un procedimiento simple de análisis de los datos, obteniéndose resultados bastante confiables.

El intervalo de referencia en forma convencional, contiene el 95% (0,95) central de la distribución de referencia y está entre dos límites de referencia, de acuerdo a los percentiles 2,5 (fractil $\mu = 0,025$) y 97,5 (fractil $1-\mu = 0,975$).

Estos límites dejan afuera una fracción de 0,025 de los valores en cada cola o extremo de la distribución de una referencia. Los percentiles deberían ser acompañados por intervalos de confianza, por ejemplo, intervalos de confianza 0,90 alrededor de cada límite de referencia.

Procedimiento para la estimación de límites de referencia:

Los procedimientos (Tabla 2) utilizados para la estimación de límites de referencia son analizados a continuación:

- 1) Recolección de datos de acuerdo a lo ya indicado.
- 2) Agrupamiento de los valores de referencia. Se realiza para reducir la variación en subclases (de acuerdo a sexo, edad, etc).

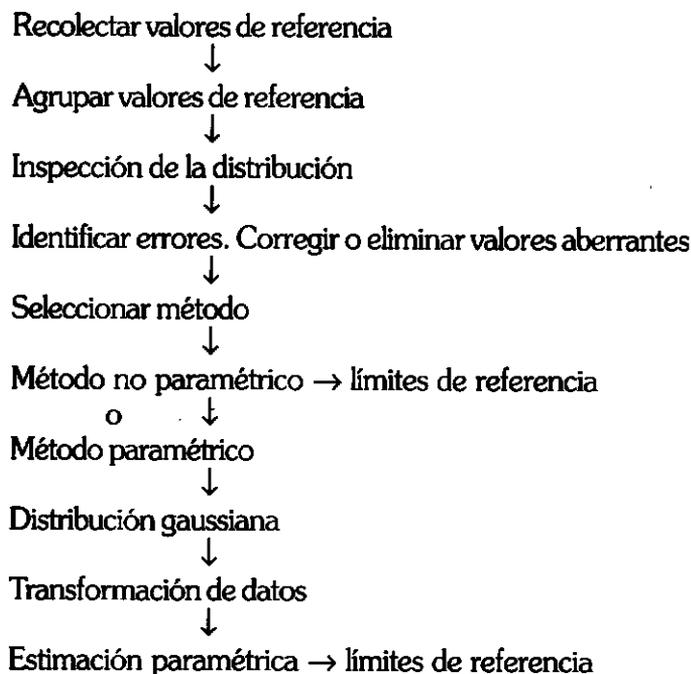
Es posible subagrupar el conjunto de valores en posibles subclases a través de pruebas estadísticas de diferencias en la localización (t de Student, análisis de la varianza, etc) o de diferencias en la variación intraclase (test F de Fisher, test de Bartlett, etc).

- 3) Distribución. Se debe examinar la distribución de los valores de referencia recopilados. Esto se realiza graficando los valores en un histograma. Debiera buscarse el sesgo, la curtosis, los valores marginales y la bi o polimodalidad.

- Distribución con sesgo positivo es asimétrica, con una cola extendida hacia la derecha.
- Distribución con sesgo negativo es asimétrica con una cola extendida hacia la izquierda.
- Curtosis es el grado de agudeza. La distribución puede ser demasiado puntiaguda comparada con la forma gaussiana, puede estar combinada en la parte central con largas colas (curtosis positiva) o ser demasiada chata o aplanada con colas cortas (curtosis negativa).
- Distribución bi o polimodal tiene dos o más picos.

En una distribución si se observa bi o polimodalidad, sesgo u otra peculiaridad puede indicar que es mixta y debiera reevaluarse los criterios de inclusión y exclusión.

Tabla 2.- Flujo de procedimientos para estimar los límites de referencia:



4) Valores aberrantes y valores marginales. Un valor aberrante puede ser originado en una gran desviación del procedimiento utilizado para la obtención de valores de referencia. Algunos pueden ser detectados como marginales, que son valores que se ubican inesperadamente lejos de la mayoría de los valores de referencia. Se identifican por inspección visual de un histograma o por aplicación del procedimiento de ajuste de Healy.

5) Método seleccionado para la estimación de límites de referencia. Cuando existe un número suficiente de valores, los percentiles (fractiles) se estiman por métodos no paramétrico o paramétrico, como ya se ha indicado.

6) Método no paramétrico. La Federación Internacional de Química Clínica (IFCC, 1987) ha recomendado el siguiente método no paramétrico que funciona tanto en los

casos de distribución normal, como en los de distribución desconocida.

- a) Deben existir a lo menos 119 valores u observaciones en que primero se calculan los límites de referencia y luego los intervalos de confianza del 90% para los límites extremos.
- b) Los datos son ordenados de menor a mayor, en lo posible con ayuda de un computador.

Por ejemplo: $n = 204$ valores

Los primeros 12 valores ordenados son:

X1	X2	X3	X4	X5	X6	X7	X8	X9	X10	X11	X12
3,50	3,52	3,53	3,53	3,58	3,58	3,60	3,60	3,61	3,65	3,68	3,70

Los últimos 12 valores ordenados son:

X193	X194	X195	X196	X197	X198	X199	X200	X201	X202	X203	X204
4,30	4,30	4,40	4,45	4,46	4,46	4,48	4,50	4,51	4,52	4,53	4,53

- c) Los límites de referencia son muy sensibles a valores aberrantes. Puede utilizarse el método de Healey para la eliminación de valores aberrantes o marginales en los extremos.
- d) Se escoge el nivel de confianza, por ejemplo: 0,95 con dos colas. Así tenemos 0,025 y 0,975

—Límite de referencia inferior = $(n + 1) \cdot 0,025$, aproximar al entero.

—Límite de referencia superior = $(n+1) \cdot 0,975$, aproximar al entero.

Siguiendo el ejemplo:

Límite inferior = $(204 + 1) \cdot 0,025 = 5,125$, aproximado a 5

Límite inferior = al valor del número 5 (**X5**) = 3,58

Límite superior = $(204 + 1) \cdot 0,975 = 199,88$, aproximado a 200.

Límite superior = al valor del número 200 (**X200**) = 4,50

e) Se calcula los intervalos de confianza para cada límite. Se utiliza la tabla de Read, Henry y Mason recomendada por la IFCC (Tabla 3).

Para nuestro ejemplo, $n = 204$; la Tabla 3 con un tamaño de muestra de 190 a 218 corresponden los números 2 y 10, por tanto el intervalo de confianza 90% para el límite de referencia inferior es $X_2 = 3,52$ y $X_{10} = 3,65$ y para el límite de referencia superior es:

$$(n+1)-2 = 205 - 2 = 203 = X_{203} = 4,53 \text{ y } (n+1)-10 = 205 - 10 = 195 = X_{195} = 4,40.$$

Conclusión:

Intervalo de referencia (0,95) = 3,58 a 4,50

Intervalo de confianza 90% límite de referencia inferior = 3,52 a 3,65.

Intervalo de confianza 90% límite de referencia superior = 4,40 a 4,53.

Finalmente es necesario indicar que el desarrollo de esta metodología permite comparar y valorar discrepancias entre los límites de referencia encontrados en el laboratorio, con los publicados en la literatura.

7) Método paramétrico. Para realizar este método se recomienda seguir los siguientes pasos:

- a) Prueba de distribución gaussiana. (Anderson-Darling).
- b) Transformación de datos. Si los datos no se ajustan a una distribución gaussiana se transforman los valores usando logaritmos o raíz cuadrada.
- c) Si se cumple la distribución gaussiana, calcular los límites de referencia por la estimación de percentiles (fractiles) y de sus intervalos de confianza.

Para una muestra de n valores se obtiene la media aritmética (\bar{X}) y la desviación estándar (DE). Para la estimación de los límites de referencia (percentiles y/o fractiles) se utiliza la siguiente fórmula:

$$\bar{X} \pm C_{1-\alpha} \cdot DE$$

y que de acuerdo a las tablas estadísticas corrientes

$$C_{1-\alpha} = -C_{\alpha}, \text{ es una desviación gaussiana estándar}$$

Para los fractiles $a = 0,025$ y $(1 - a) = 0,975$, intervalo de referencia 0,95

$$C1-\alpha = 1,960$$

Para los intervalos de confianza 0,90 de los límites de referencia (percentiles y/o fractiles) se ha sugerido la siguiente formula:

$$\text{límite de referencia (fractil)} \pm 2,81 \cdot DE / \sqrt{n}$$

La estimación de percentiles es más imprecisa a menor tamaño de muestra. La determinación de percentiles 2,5 y 97,5 requiere a lo menos 40 valores. Cuando existen criterios de partición, como edad y sexo, el tamaño de la muestra debe ser al menos de 119.

Tabla 3.- Intervalos de confianza no paramétricos de límites de referencia, según Reed, Henry y Mason. Intervalos de confianza del 90% del fractil 0,025 para un número de valores de 119 a 1000.

Tamaño muestra	Número inferior	rango superior	Tamaño muestra	Número inferior	rango superior
119-132	1	7	566-574	8	22
133-160	1	8	575-598	9	22
161-187	1	9	599-624	9	23
188-189	2	9	625-631	10	23
190-218	2	10	632-665	10	24
219-248	2	11	666-674	10	25
249-249	2	12	675-698	11	25
250-279	3	12	699-724	11	26
280-307	3	13	725-732	12	26
308-309	4	13	733-765	12	27
310-340	4	14	766-773	12	28
341-363	4	15	774-799	13	28
364-372	5	15	800-822	13	29
373-403	5	16	823-833	14	29
404-417	5	17	834-867	14	30
418-435	6	17	868-871	14	31
436-468	6	18	872-901	15	31
469-470	6	19	902-919	15	32
471-500	7	19	920-935	16	32
501-533	8	20	936-970	17	33
534-565	8	21	971-1000	17	34

Para obtener los números de rango del fractil 0,975 restar el número de rango de la tabla al valor $n+1$ (n tamaño de la muestra).

PRESENTACIÓN Y USO DE VALORES DE REFERENCIA

Un valor observado de un analito o parámetro entrega una información significativa solamente cuando se compara a valores de referencia. El laboratorio tiene un rol central en apoyar al clínico en la interpretación del valor observado, suministrando valores de referencia relevantes y presentarlos en forma conveniente y práctica.

El valor observado de un individuo en particular se compara frente a un intervalo que contiene una fracción definida del valor de referencia. La comparación del valor observado con el de referencia debe considerar la aplicación que se le quiere dar, por ejemplo, estudio de cambios fisiológicos, detección temprana de una enfermedad, diagnóstico diferencial, monitoreo de la respuesta a una terapia, estudio del efecto de condiciones ambientales, etc.

Cuando se observan diferencias entre el valor observado y el de referencia, es importante tener presente que es una significación estadística (acción descriptiva) y no necesariamente implica una significación médica. La acción interpretativa se basa sobre consideraciones clínicas, bioquímicas y fisiológicas.

Los valores de referencia pueden ser presentados en la forma de tabla, gráficos o figuras. Cuando corresponde, deben ser entregados de acuerdo a edad, sexo, etc. Debe incluir el intervalo de referencia que comprende, en general, el 95% central de los valores de referencia con los límites en los percentiles 2,5 y 97,5. Si no se dispone de valores propios, debe indicarse la fuente de obtención de los valores de referencia y el método analítico utilizado. No se utiliza el término "rango" debido a que debiera restringirse a la diferencia entre el límite más alto y más bajo de un intervalo.

Los valores observados de acuerdo al intervalo de referencia pueden ser clasificado en:

- a) **excepcionalmente bajo**, situado por debajo del límite de referencia más bajo;
- b) **corrientemente observado**, entre o igual a los límites de referencia y
- c) **excepcionalmente alto**, situado por sobre del límite de referencia más alto. No se recomienda el uso de valores "anormal", "patológico" o "normal" debido a la posible confusión entre el significado de normal estadístico y normal fisiológico. Un valor anormal puede ser solamente estadístico y no de ocurrencia patológica.

BIBLIOGRAFÍA

- Solberg H.E. The concept of Reference Values. *Acta Bioq. Clin. Latinoamericana* 1988, XXII N°2; 297-303.
- PetitClerc C. Solberg H.E. Selection of Individuals for the production of Reference Values. *Acta Bioq. Clin. Lationamerica* 1988; XVII N°3: 443-451.
- Solberg. H.E. PetitClerc C. Preparations of Individuals and collection of specimens for the production of Reference Values. *Acta Bioq. clin. Latinoamerica* 1988; XXII N°4: 603-611
- Solberg. H.E. Statiscal Treatment of Collected Reference Values. determination of reference Limits. *Acta Bioq. Clin. Latinoamerica* 1988 ; XXII N°3: 45-472.
- Dybkar R. Solberg H.E. Presentation of Observed Values related to Reference Values. *Acta Bioq. Clin. Latinoamerica* 1988; XXII N°4: 613-620.
- Solberg H.E. A guide to IFCC recommendations on Reference Values *J.Int. Fed. Clin: Chemis.* 1993; N°5: 160-164.

Capítulo XV

GLOSARIO

GLOSARIO

Alicuota: Es una parte determinada de un todo con su misma composición. Término general que se refiere a cualquier disolución, muestra, mezcla, etc.

Analito: Componente a analizar.

Calibración: Procedimiento mediante el cual se relaciona la lectura con la magnitud que se va a medir.

Contaminación entre muestras: Influencia de una muestra sobre la siguiente. Problema que afecta a los instrumentos automatizados.

Control de calidad: Estudio de aquellos errores de los que es responsable el laboratorio y de los métodos empleados para reconocerlos y minimizarlos. Este estudio incluye todos los errores que surgen en el laboratorio desde la recepción de la muestra hasta la salida del informe.

Control de calidad interno (o intralaboratorio): Procedimiento por el cual se emplean los resultados de un solo laboratorio con fines de control de calidad.

Control de calidad externo (o interlaboratorios): Procedimiento por el cual se emplean los resultados de varios laboratorios que analizan el mismo espécimen con fines de control de calidad.

Calibrador (Ver Patrón).

Error: Diferencia entre una sola medida de una magnitud y su valor verdadero o de consenso. Esta diferencia o desviación (positiva o negativa) puede expresarse en las mismas unidades que la magnitud medida o como porcentaje del valor verdadero. Si no se conoce el valor verdadero se puede expresar como la diferencia con un valor asignado.

Error determinado (o sistemático): Error originado por causas identificables y corregible.

Error indeterminado (causal o aleatorio): Error originado por causas aleatorias o fortuitas y probablemente no corregibles.

Especificidad: Capacidad de un método analítico para determinar únicamente el (los) componente(s) que se desea(n) medir. No tiene valor numérico. Se evalúa a través de la experiencia disponible sobre los componentes que contribuyen al resultado. (Ver Inespecificidad).

Espécimen (muestra): Material disponible para el análisis, o material enviado al laboratorio para su caracterización.

Exactitud: Concordancia del valor medio calculado de una magnitud con el valor verdadero o de consenso.

Imprecisión: Es la desviación estándar o coeficiente de variación de los resultados de una serie de determinaciones repetidas. Debe dejarse constancia del valor medio y el número de repeticiones, así como el esquema empleado, con el fin de que otros analistas puedan repetirlo.

Inexactitud: Es la diferencia numérica entre el valor medio de una serie de resultados repetidos y el valor verdadero. Esta diferencia (positiva o negativa) puede expresarse en las mismas unidades en que se mide la magnitud, o como un porcentaje del valor verdadero.

Interferencia: Es el efecto de un componente que aunque por sí solo no da ninguna lectura, actúa sobre la exactitud de la medida de otro componente.

Intervalo analítico: (rango analítico) Es el intervalo de concentración o de otra magnitud para el cual el método es aplicable sin modificación.

Límite de detección: Es el menor resultado que puede distinguirse de un blanco adecuado con una probabilidad de acierto preestablecida. El límite puede ser una concentración o cualquier otro tipo de magnitud, y se define como el punto a partir del cual es factible el análisis.

Material de control: Material empleado con fines de control de calidad. En la medida

de lo posible este material debe ser de composición lo mas similar posible al de las muestras analizadas por el laboratorio; tanto en su composición físico - química (matriz) como en sus niveles de concentración.

Método analítico: Conjunto de instrucciones escritas que describen el procedimiento, materiales y equipo que le son necesarios al analista para obtener un resultado.

Patrón: Material o disolución con la que se compara la muestra con el propósito de determinar su concentración o cualquier otra magnitud.

patrones de calibración (algunas veces llamados **calibradores**) para evitar confusión con otros significados técnicos o coloquiales de la palabra patrón.

Precisión: Aproximación entre los valores obtenidos por repetido.

Sensibilidad: (Grado de detección) Es la capacidad de un método analítico para detectar pequeñas cantidades del componente a analizar.

Valor certificado: Valor certificado por un organismo oficial y sujeto a las condiciones establecidas por el propio organismo.

**Este libro se terminó de imprimir
en enero de 1998, en los talleres de
JC Productores Gráficos Ltda.,
Santiago de Chile.**

***Coordinación de Producción:*
Dr. Hugo Unda Díaz M.V.
Departamento Laboratorios de Salud
Instituto de Salud Pública de Chile**

2357

WA25
I59
1998

CENTRO DE DOCUMENTACION

MINSAL/OPS/OMS



INSTITUTO DE SALUD PÚBLICA DE CHILE