

# 24

## Control de Calidad Metodológico

En este capítulo se desarrollan diferentes formas de controlar la *calidad* en las mediciones de los laboratorios de análisis industriales o bioquímicos. Específicamente, de los métodos o técnicas usadas en la práctica diaria de los mismos. El primer paso hacia la calidad es calibrar los instrumentos, el segundo es calibrar los métodos y el tercero asegurar que estas calibraciones sean estables en el tiempo, mediante las cartas de control que se verán en el próximo tema. El concepto de *calidad* se toma aquí en el sentido de precisión y exactitud, como condición necesaria para alcanzar el objetivo principal: *la capacidad del método clínico para diagnosticar*. El campo de aplicación se restringe a las magnitudes clínicas de tipo cuantitativo. Otra limitación es que se trata de controles de tipo puntual, es decir con respecto a un solo valor de la magnitud, en lugar de controles del tipo: *recta de calibración*, donde se toman varios puntos. En la última sección se trata el Control de Calidad en la parte Microbiológica de acuerdo a las recomendaciones de la Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica.

### 24.1 Conceptos básicos

Otra vez, el problema básico del control es determinar que se tendrá primero: si un patrón para calibrar un sistema, o un sistema calibrado para fabricar un patrón. Por caso, si se dispone de un suero control bien controlado, se puede calibrar una técnica de laboratorio. En cambio, si se dispone de una técnica calibrada, se pueden fabricar patrones secundarios como un *pool* de sueros, para controlar en el tiempo la estabilidad del método en forma económica y simple.

Resuelto este problema, cuando se dispone de un suero control o similar se procede a calibrar la técnica en su conjunto, o en algunas de sus partes. En efecto, un sistema de medición clínico se puede descomponer en cuatro partes intervinientes:

-*Factor humano*: Todas las personas participantes en la medición.

-*Instrumentos y equipos*: Los que se emplean para realizar la medición como espectrofotómetro, centrífugas, estufas, pipetas, buretas, etc.

-*Drogas y reactivos*: Son los kits comerciales para la determinación, agua tridestilada para las diluciones, ácidos para lavar, etc.

-*Método*: Se trata de los varios pasos que componen toda técnica: *su protocolo*.

Cada uno de estos factores, puede producir desviaciones que alteren significativamente los resultados finales de la medición. Por lo tanto, es necesario diseñar controles para poder detectar tales desviaciones en cada una de las partes, lo mismo que para todo el conjunto.

Cuando se hayan calibrado todas las técnicas de laboratorio, y se mantengan controladas a lo largo del tiempo con las cartas estadísticas, se puede plantear un objetivo más amplio. Tal como comparar el laboratorio con los demás de la zona y asegurar que todos los laboratorios produzcan valores analíticos con una calidad adecuada. Este tipo de controles *inter-laboratorios* se inscriben dentro de un marco de excelencia exigida por la medicina moderna. El requerimiento básico para lograrlo es que, todo el personal involucrado en el proceso esté imbuído de las causas de las imprecisiones analíticas, los modos de detectarlas y corregirlas pero, sobre todo, que sea conciente de la necesidad y utilidad del Control de Calidad Estadístico.

## 24.2 Sueros controles y patrones

Para poder calibrar técnicas clínicas se necesitan sustancias de control como:

- *Patrones acuosos*: Se preparan con agua tridestilada, a la cual se le adicionan las sustancias puras o proteínas, de manera tal de tener una concentración adecuada a los fines de control.
- *Sueros calibrados*: Se adquieren en el mercado y fueron calibrados por laboratorios de referencia legalmente autorizados. A su vez, estos sueros pueden provenir de sueros *humanos* o de *animales* (es mejor el humano, pero es el más caro).
- *Sueros de referencias o secundarios*: Usando los sueros primarios, se calibra el sistema de medición, y luego, empleando un *pool* de sueros, obtenido con el sobrante del mismo laboratorio, se procede a calibrarlo. Este *pool* ya calibrado se puede emplear para seguir controlando al sistema en forma más económica.

A los fines de conservación, estos patrones se almacenan congelados o liofilizados que es como se venden en el mercado. Si bien el tipo liofilizado es el más estable, tiene el problema de los posibles errores agregados al efectuar la dilución. A su vez el *pool* congelado puede variar su composición, por la degradación de alguno de sus componentes en el tiempo o por la condensación de la humedad ambiente, si no se toman recaudos apropiados.

La técnica mas difundida en los laboratorios es el empleo del *pool* de sueros séricos o de orinas para realizar el control. Hay varias razones para ello: su costo es bajo, su conservación no es costosa ni demasiado sofisticada y principalmente, es la más representativa de todas. En efecto, un *pool* se arma con el adecuado suero sobrante de los pacientes del mismo laboratorio, por eso sus componentes son representativos de la población humana que lo circunda. Mucho más adecuada, que si se emplea un suero de otro país o de tipo animal.

Cuando en la década del cincuenta se comenzaron a efectuar estudios comparativos, entre distintos laboratorios de una misma ciudad (Washington, Tokio, Roma, París, etc.) se repartieron muestras de soluciones acuosas, sueros y orinas provenientes de un mismo *pool*. Como las muestras tenían un mismo origen, se esperaban valores similares obtenidos en los distintos laborato-

rios de la ciudad. Los resultados obtenidos fueron alarmantes. Se encontraron discrepancias por fuera de los límites propuestos como aceptables, en más del 80% de los casos. Como no se podían clausurar a semejante cantidad de laboratorios a la vez, se optó por la política de darles un tiempo para corregir sus técnicas de medición. Y eso fue el surgimiento de las técnicas de control de calidad y de las distintas asociaciones profesionales que se ocupan del tema. Muy pronto surgieron los planes de control entre laboratorios, como una forma de asegurar la calidad de sus resultados. De allí surgieron una serie de necesidades:

- Las muestras de control debían ser equivalentes entre sí.
- Los componentes debían ser estables durante prolongados períodos de almacenamiento.
- Debía disponerse de grandes cantidades para su empleo en diferentes laboratorios.
- Se necesitaba asegurar la estabilidad del producto durante los traslados.

Todo esto creó con el tiempo, industrias dedicadas a la fabricación de sustancias de control. En la actualidad, la mayoría de los productos utilizados provienen de un gran pool de sueros en forma liofilizada. Los fabricantes de muestras de control almacenan ingentes cantidades de plasma sanguíneo obtenido de diversas fuentes: bancos de sangre con productos vencidos, sobrantes de hospitales donantes, etc. Se trasladan congelados a  $-7^{\circ}$  C hasta la planta de producción, donde se los almacena hasta lograr miles de litros de plasma. Luego se procede a desfibrarlos y suplementarlos con diversos agentes para obtener las concentraciones adecuadas, y a continuación se los mezcla, filtra y almacena en viales adecuados. Estos viales son liofilizados y tratados con Nitrógeno. Los cuidados, controles y verificaciones durante todo el proceso de fabricación deben ser en extremo exhaustivos, como para poder asegurar un  $CV < 1\%$ . La humedad residual en el proceso de liofilización se baja hasta un 2%, y se trabaja con el suero a bajas temperaturas para evitar deterioros. En general, se asegura un  $CV = 1\%$  en el producto final. Los sueros liofilizados suelen ser muy estables, salvo casos aislados de pérdida de glucosa por contaminación bacteriana, o cambios producidos por actividad enzimática. En la práctica, conviene emplear los sueros liofilizados para controles de exactitud, luego fabricar patrones secundarios suficientes, como para un semestre por los menos. Entonces, con el material no evaluado sobrante se pueden realizar los controles de precisión, a fin de bajar los costos totales del control de calidad. Los requisitos a cumplir por estos materiales, de acuerdo a las normas internacionales son:

- Estabilidad de los componentes de por lo menos un año.
- Almacenamiento a  $-20^{\circ}$  C o liofilización.
- Resultados negativos para anticuerpos con antígenos HIV I y HIV II, HCV y HBV.
- Concentraciones cercanas a las habituales del laboratorio.
- Valores que faciliten las decisiones médicas.
- Variaciones entre viales que no superen un CV del 1%.
- Baja turbidez.
- Provenientes de sangre humana (o en su defecto de animales).

## 24.3 Protocolo de las técnicas

La principal cualidad de una técnica clínica es su estabilidad y repetibilidad para hacer las determinaciones. Cualquier cambio, por pequeño que parezca a primera vista, puede alterar el resultado final de la medición, lo cual invalida las comparaciones necesarias para detectar los problemas cuando la técnica se sale de control. Por eso, es necesario el establecimiento en cada técnica de un *protocolo* de medición, para minimizar al máximo las desviaciones. La idea básica es saber las causas que producen efectos indeseables, para evitarlas con el protocolo del método. Por ejemplo, si se va a realizar un estudio microbiológico de orina, se sabe que el recipiente que la contiene no debe estar contaminado, entonces el protocolo debe establecer la obligación de emplear recipientes previamente esterilizados. Lo ideal sería disponer de una especie de manual, que contenga el protocolo a seguir, en términos generales, para cada una de las prácticas de laboratorio que figuran en el Vademécum, o por lo menos, de las más comunes. Con una herramienta de esa naturaleza se podría unificar en el país la metodología de los laboratorios y uniformar mejor los resultados informados. Como la cantidad de información al respecto es demasiado grande, y día a día se incrementa con reportes de investigadores en las revistas especializadas, es casi imposible que un solo laboratorio confeccione un conjunto de protocolos actualizados con las últimas novedades. Lo apropiado sería que las universidades en conjunto con las asociaciones profesionales, mantengan un sistema al efecto, recurriendo a los especialistas de cada área. Mientras tanto, parece conveniente recurrir a los lineamientos generales publicados por ECCLS, IFCC y WHO en Copenhague (1992), titulados “Pacientes y muestra” y “Prácticas correctas en las mediciones clínicas descentralizadas”, puntualizando algunos aspectos a tener en cuenta.

En la *Fase Preanalítica* los puntos a considerar son:

1) *Preparación del paciente*: Los factores referidos al paciente pueden clasificarse en dos grupos principales. Aquellos que no se pueden cambiar y los otros que pueden controlarse por medio del mismo paciente, el laboratorio o el médico. Ejemplos del primer caso son, sexo, edad, embarazo, fase del ciclo menstrual, origen étnico, etc. Mientras que en el segundo caso una intervención activa de los participantes puede manejar factores como: tensión mental (stress), ejercicio, trabajo muscular intenso, dieta, medicación, ingesta de etanol, fumar, postura, tiempo de reposo y/o tiempo de ayuno previo, procedimientos como masaje o palpación, etc.

2) *Tiempo de muestreo*: Los cambios en los sistemas biológicos ocurren usualmente siguiendo *ritmos biológicos* como el ritmo menstrual de 28 días, o el circadiano de 24 hs. Por lo tanto, es necesario la comprensión del efecto de estos ritmos para programar la toma de muestras e interpretar sus resultados. Deben tomarse las muestras en el mismo momento del ciclo si se van a comparar resultados *intra* o *inter* individualmente. Por su parte, las pruebas dinámicas o pruebas de supresión o estimulación, se usan para estudiar la respuesta de los órganos a estímulos negativos o positivos, lo que implica una previa programación en cuanto al tiempo. Por ejemplo, la creatinquinasa es una isoenzima que requiere un tiempo de 6 a 30 hs después del infarto del miocardio para obtener resultados diagnósticos confiables.

3) *Cantidad de prestaciones*: La cantidad o volumen de muestra a extraer necesita el conocimiento del número de prácticas a realizar y sus posibles derivaciones o repeticiones, para que sea adecuada. A su vez, esto requiere conversaciones entre médicos y especialistas para determinar la

combinación, conveniencia, economía, etc., de la batería de prácticas a realizar. Por supuesto, se debe tener conocimiento de cada protocolo para tener información acerca de:

- Cantidad mensurable necesaria en la práctica.
- Interpretación de resultados.
- Indicaciones a darle al paciente antes de la recolección.
- Formas de tomar la muestra, manera de almacenarla y de manejarla.
- Listado de errores y/o equivocaciones que se deben evitar.

4) Identificación correcta: El paciente debe ser correctamente identificado, con todos sus datos personales y sus muestras con una etiqueta que especifique: su nombre, edad y sexo, la fecha de la toma y el tipo de muestra. Esta etiqueta debe ser colocada en el frasco y no en la tapa, también debe soportar la humedad del freezer o la luz solar si afecta la muestra.

5) Toma de muestra: Es necesario que la toma de muestra se haga correctamente, bajo condiciones que eviten la aparición de errores, tanto de medición como de interpretación. El tipo de muestras debe ser escogido con cuidado de acuerdo a la investigación a realizar. Las muestras de sangre pueden ser de tipo: arterial, venosa o capilar; las de orina pueden ser aleatorias, del chorro medio o con horarios; las microbiológicas deben tomarse del lugar adecuado; por ejemplo, en una investigación de gonorrea el hisopo se ubica en la región cervical y no en la vaginal. Un detallado protocolo e instrucciones escritas con explicaciones verbales al paciente, son la mejor forma de prepararse para la toma de muestras. En la bibliografía clínica se encuentra muy detallado el caso de extracción de sangre por venipunción como ejemplo de lo anterior.

6) Interferencia: Algunas sustancias solubles se pueden escurrir en tubos, viales o tapones y pueden afectar notablemente el resultado final. Por ejemplo, el 2 butoxietilo (tris) provoca el desplazamiento de drogas y otros analitos, causando redistribución de eritrocitos y plasma. Los tubos revestidos también son afectados y pueden interferir en la unión antígeno-anticuerpo o inhibir actividad enzimática. Lo recomendado es *evitar el contacto entre tapón y sangre*. Los separadores de suero pueden interferir en la veracidad de las mediciones, o la luz solar afectando las mediciones de bilirrubina, etc.

7) Tipo de muestras: Existen diferentes tipos de muestras y cada uno necesita de recaudos especiales que no se detallaran aquí, baste mencionar algunos de ellos:

- |                       |   |
|-----------------------|---|
| - Muestras de sangre. | - Muestra de liquido amniótico.         |
| - Muestras de orina.  | - Muestras de líquidos cefalorraquídeo. |
| - Muestras de saliva. | - Muestras de heces fecales.            |

Y otros tipos menos comunes como las muestras genitales, vaginales, cervicales, uretrales, faríngeas, esputos, pus, o exudaciones, fluido serosos, superficies cutáneas o mucosas, y otras especiales como las biopsias.

8) Manejo de muestras: Todas las precauciones que se adopten para el manejo de muestras nunca alcanzan para asegurar un 0% de riesgo. No se debe olvidar que toda muestra debe ser manejada como *potencialmente infecciosa* y se debe cuidar la seguridad tanto del operador como la del resto del personal. Evitar contaminación de recipientes o del medio ambiente, aún cuando no sean obvios los riesgos de una infección. Otras precauciones importantes son: el evitar el contacto en-

tre tapón y muestra, lavado y secado cuidadoso, evitar evaporaciones, exposición a luz solar o a temperaturas excesivas, añadir los conservantes o preservativos y aditivos de forma que no altere la muestra mas allá de lo admisible.

9) *Almacenamiento y transporte de muestras*: Además de la esterilización previa, conviene un cerramiento hermético y sellado en caso de transporte fuera del laboratorio. Es importante tomar en cuenta el tiempo entre la extracción y el procesamiento, tratando de que sea lo mas corto posible. En su defecto, habrá que almacenar la muestra en refrigeradores o a temperatura ambiente cuando el frío provoque interferencia en la medición.

Todo lo anterior corresponde a la fase *pre-analítica* del método, o sea, desde la toma de la muestra, hasta el proceso de medición. La fase *analítica* del método se ve a continuación.

## 24.4 Protocolo de la fase analítica del método

En el apartado anterior se mostró la necesidad de contar con un protocolo detallado para la fase pre-analítica de los métodos clínicos. Se listaron una serie de puntos a tener en cuenta cuando se redacta un protocolo adecuado para cada caso. Eso cubre la parte de controlar la calidad desde el punto de vista de las precauciones a adoptar en la recolección de las muestras. La otra parte que falta, es la redacción del protocolo de la técnica de medición adoptada en cada caso particular, no solo debe ser claro y sencillo, sino que es imprescindible que todo el personal esté imbuído de la necesidad de seguir las normas a rajatabla. La única manera de calibrar una técnica es que el procedimiento sea repetitivo en las mediciones de control e igual al habitual que se usa en la rutina diaria.

Conviene aclarar un concepto: la *repetibilidad* de los resultados de mediciones de diferentes pacientes, esta sujeta a las condiciones siguientes:

- Mismo procedimiento de medición.
- Mismo observador, equipos e instrumentos.
- Misma ubicación.
- Mismas condiciones de uso.
- Mediciones realizadas en forma sucesiva (mínimo período de tiempo)

Por su parte, el concepto de *reproducibilidad* de mediciones, se refiere a la proximidad entre los resultados de las mediciones de la misma magnitud medida, sus condiciones son:

- Mismo procedimiento de medición.
- Diferentes observadores, equipos o instrumentos.
- Distintas ubicaciones.
- Distintos momentos.

La manera de calibrar es similar a las ya vistas. Con un suero control adecuado, se puede controlar la exactitud con el modelo Student y la precisión con la Chi-cuadrado. Análogamente, se puede comparar dos muestras para estudiar el efecto de algún factor sobre las mismas, para

detectar las causas de salida de control del sistema de medición o para investigación. De la comparación entre el promedio de las mediciones repetidas de un mismo suero control y el valor calibrado del mismo, se detecta la presencia de un error sistemático y se lo valida con el test estadístico. De probar la existencia del mismo, se lo cuantifica como la diferencia entre ambos valores y se pueden corregir las mediciones realizadas, o bien revisar el método a fin de eliminarlo. Si la experiencia no alcanza para detectar las causas de un error sistemático, se las puede investigar a través de comparaciones de medias haciendo variar un factor sospechoso de modo controlado. Y así, hasta encontrar los agentes que provocan el error. Si no se los puede eliminar, por lo menos se debe acotarlos.

La manera de proceder con la precisión es algo diferente a la vista en el control instrumental. Ahora, el criterio para adoptar ( $\sigma_{\text{máx}}$ ) *la desviación máxima admisible* se basa en consideraciones clínicas, antes que en la precisión propia del instrumento. Esto se debe, a que en este caso, se calibran métodos cuyo objetivo final y principal es el diagnóstico. El *criterio de Thonks* es el más popular y antiguo adoptado por los bioquímicos.

$$CV\%_{\text{máx}} = 0,75 \frac{\text{Rango del intervalo de referencia}}{\text{Media del intervalo de referencia}} 100$$

De donde, se puede obtener para el caso de una calibración:

$$\sigma_{\text{máx}} = \mu \cdot CV\%_{\text{máx}}$$

Siendo  $\mu$  el valor calibrado del suero control. Hay dos excepciones:

- 1) Para metabolitos en general se acepta un 10 % en el CV%.
- 2) Para enzimas en general es aceptable un CV% hasta un 20%.

En la Tabla 24.1 se presentan ejemplos de los valores de *Thonks* en las prácticas más usuales, comparándolos con los de otro nuevo criterio: el de *Aspen*. Este último fue presentado en la conferencia internacional del mismo nombre en 1977. Se basa en que: *la variabilidad biológica en una medición clínica es la misma, independientemente de la edad de paciente, del método elegido, del número de pacientes y de la condición de sano o enfermo crónico*. Se calcula como la mitad de la variabilidad biológica intraindividual expresado en términos del CV.

**Tabla 24.1: Valores de desviación máxima aceptable.**

Sangre o Plasma	Thonks		Monitoreo de Aspen		Prueba de Tamiz	
	EMA	CV% <sub>máx</sub>	EMA	CV% <sub>máx</sub>	EMA	CV% <sub>máx</sub>
Glucosa	10,0	5,0	5,6	2,8	9,6	4,8
Urea	10,0	5,0	11,1	5,6	17,7	8,9
Colesterol	10,0	5,0	8,5	4,3	15,1	7,5
Urato	10,0	5,0	11,9	6,0	18,0	9,0
Proteína	7,1	3,6	3,0	1,5	4,8	2,4
Creatinina	10,0	5,0	6,3	3,2	11,9	6,0
Ion Sodio	1,6	0,8	0,5	0,3	0,8	0,4
Ion Potasio	5,3	2,7	1,6	0,8	2,2	1,1

EL EMA (*Error Máximo Admisible*) se define de acuerdo a varios criterios, algunos se basan en los intervalos de referencia poblacionales, otros totalmente subjetivos de acuerdo a la opinión de expertos, algunos generosos, otros exigentes. Todos suponen la eliminación de los errores sistemáticos y un nivel de significación del 95 %. Luego se define el *Coficiente analítico de variación* como la mitad del EMA: su desventaja es su gran dependencia con los valores poblacionales y el sistema de medición empleado.

Una característica importante del suero como material de control, con un valor asignado en forma analítica, es la aparición de *efectos de tamiz*. En cambio, con sueros acuosos esto no ocurre. A veces, un calibrador simple puede no ser adecuado al caso en cuestión y también se debe validar. La tabla anterior ilustra lo dicho con algunos ejemplos. Es importante que cada laboratorio determine por algunos de estos criterios, el valor máximo de variabilidad aceptable ( $\sigma_{\text{máx}}$ ) para cada técnica en particular. Luego podrá hacer experimentos para ver si su técnica se mantiene dentro de esos valores y si es estable en el tiempo. Cosa que *debe constar* en el protocolo correspondiente.

## 24.5 Controles del método de rutina

Una vez conseguida la cantidad suficiente de sustancia de control (patrones) como para calibrar una técnica específica, definida su máxima dispersión admisible y con un protocolo detallado a seguir en la rutina, se está en condiciones de comenzar a calibrarla. La idea, una vez más, es que mediciones repetidas de una misma muestra fraccionada en alícuotas tienen una distribución de los errores de tipo gaussiano; en las condiciones explicadas en la Teoría de Pequeñas Muestras. Por eso, se pueden aplicar los modelos de Student, Chi-cuadrado y Fisher.

Cuando se efectúe una calibración por primera vez, los pasos a seguir son:

*Paso 1)* Tratar la sustancia control de la misma manera que la utilizada en la rutina diaria, respetando estrictamente el protocolo establecido para la técnica de medición.

*Paso 2)* Realizar  $n$  mediciones usando  $n$  alícuotas de la misma muestra y empleando al mismo operador, equipo y drogas en todos los casos. Así, se reduce al máximo la variabilidad metodológica (repetibilidad).

*Paso 3)* Con los  $n$  valores obtenidos se calculan la media  $\bar{x}$  y el desvío estándar DS.

*Paso 4)* Testear exactitud con el modelo de Student para una sola muestra; comparando la media muestral  $\bar{x}$  con el valor del patrón  $\mu$  y determinar la existencia de errores de tipo sistemático.

*Paso 5)* Testear precisión con el modelo de la Chi-cuadrado comparando el desvío estándar muestral DS contra la máxima admisible  $\sigma_{\text{máx}}$  y determinar la existencia de errores casuales de una magnitud indeseable.

*Paso 6)* Si en alguna de las dos pruebas estadísticas hechas, se detectan variaciones que hagan rechazar la hipótesis nula, entonces hay que revisar todo el sistema de mediciones y corregir lo que sea necesario, hasta lograr que la sucesión de pasos 1 a 5 tenga éxito.

*Ejemplo 1)* Se dispone de un suero control calibrado para Proteínas en 8,24 g/dl. Aplicando la rutina diaria se efectúan 9 mediciones y se obtiene un promedio de 7,9 g/dl con un desvío estándar de 0,3g/dl. Decidir si la técnica empleada por el laboratorio está calibrada.

Para controlar la exactitud se formula la hipótesis de que no existe error sistemático y se aplica el modelo de Student para una muestra. O sea,  $H_0 : \mu = 8.24\text{g/dl}$

$$t = \frac{(7,9 - 8,24)}{0,3 / \sqrt{9}} = - 3,4^{**} \quad \text{Se decide rechazar la hipótesis planteada con el 99\% de confianza.}$$

Se encontró evidencia muy significativa que prueba de la existencia de un error sistemático por defecto de ES = - 0.34 g/dl. Entonces hay dos opciones, la primera es corregir las mediciones restando el valor de ES a cada una de ellas, la segunda, es revisar la técnica de medición hasta detectar la causa del error producido y corregirla.

Para controlar la precisión se emplea el criterio de Thonks y se calcula:

$$\sigma_{\text{máx}} = \mu \cdot \text{CV\%}_{\text{máx}} = 8,24 \text{ g/dl} \cdot 3.6\% = 0,297 \text{ g/dl}$$

Luego se formula:  $H_0 : \sigma \leq 0.297 \text{ g/dl}$  y el sistema tiene una precisión aceptable.

$$\chi^2 = (9 - 1) \frac{(0,3)^2}{(0,297)^2} = 8,16 \text{ valor no significativo, o sea, no hay prueba de dispersión indeseable.}$$

*Ejemplo 2)* El bioquímico a cargo del caso anterior, decide investigar el origen del ES encontrado. Sospecha que se debe a una contaminación del kit empleado y decide abrir uno nuevo para investigar. Repite lo actuado con 4 mediciones y obtiene una media de 8,15 g/dl con un desvío de 0,25 g/dl. A la luz de ésta información, decidir si el problema se ha solucionado.

$$t = \frac{(8,15 - 8,24)}{0,25 / \sqrt{4}} = - 0,72 \quad \text{Valor no significativo}$$

Se concluye que el problema estaba en el Kit. Se solucionó el error sistemático. Se puede hacer un nuevo test para ver si hay diferencia entre los kits con:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (\mu_1 - \mu_2)}{\sqrt{\left(\frac{DS_1^2}{n_1}\right) + \left(\frac{DS_2^2}{n_2}\right)}} = \frac{(8,15 - 7,9) - (0)}{\sqrt{\left(\frac{0,25^2}{4}\right) + \left(\frac{0,3^2}{9}\right)}} = 1,56 \text{ (no significativo)}$$

El cual se contrasta con  $t_{\alpha;v}$  donde  $v = n_1 + n_2 - 2$  grados de libertad. Resultando que no se puede rechazar la hipótesis nula. Esto es no hay diferencia entre los kits. Notar que *a pesar saber que uno de ellos está descalibrado y el otro no*, cuando se los compara entre sí, no se detectan diferencias en exactitud.

Con respecto a la comparación en dispersión de ambos kits, se puede usar el modelo de Fisher con  $H_0 : \sigma_1^2 = \sigma_2^2$  y se supone que ambos tienen la misma precisión.

$$F = \frac{(n_2 - 1)DS_1^2}{(n_1 - 1)DS_2^2} = \frac{(9 - 1)0,25^2}{(4 - 1)0,3^2} = 1,85 \text{ valor no significativo.}$$

Por lo que tampoco se detecta diferencias entre ambos kits, como era de esperar.-

## 24.6 Control de Calidad en Microbiología

Los siguientes conceptos han sido extractados de la obra “Mejoría Continua de la Calidad” editada por Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica. Se recomienda seguir un programa de Control de Calidad Interno, estructurado, exacto y periódico, complementado con un programa externo. El programa de control interno, consiste en realizar en forma periódica una comprobación de las condiciones operativas de los aparatos de los instrumentos, juntos con los antiseros, medios de cultivo reactivo y tinciones empleados en la rutina diaria. El Control de calidad de los equipos, requiere de supervisar y registrar las operaciones que se realizan. En la Tabla 24.2 se resumen los controles a realizar al respecto.

También se debe controlar los medios de cultivo para asegurar su preparación adecuada. Se realizan tres tipos de controles de calidad para los medios:

1) *Control de esterilidad*: De cada lote disponible se eligen al azar de un 2 a un 5 % de los mismos. Luego se los somete a control incubando durante dos días para bacterias a 35-37°C o durante 5 días para hongos a temperatura ambiente.

2) *Control de calidad*: Algunos medios de cultivo se incuban con dos especies, por lo menos, de microorganismos que crecen en el medio. Uno que revela un grupo de especificaciones medias y otro con distintas especificaciones. Por ejemplo, si un medio de cultivo como el Agar SS es selectivo uno de los microorganismos como la *Salmonella spp.* crecerá y el otro en cambio no crecerá, como la *Escherichia Coli*, en una aerobiosis de 24 horas En la Tabla 24.4 se muestran algunos microorganismos para realizar el control de calidad

3) *Control de fecha de caducidad*: Se debe revisar que el medio de cultivo no se haya pasado de su fecha límite. Cada caja debe estar etiquetada con la aclaración del nombre del cultivo y la fecha de la preparación del mismo. A partir de ahí, se puede deducir su fecha de caducidad siguiendo los datos mostrados en la Tabla 24.3. Pero en general duran 15 días si se los guarda en heladera (4°C) y sin bolsa de plástico; mientras que los envasados en bolsas duran cuatro veces más.

Esta serie de recomendaciones efectuadas por la Confederación Latinoamericana se basan en la idea de que estos controles debe ser rutinarios en un laboratorio clínico, a diferencia de lo usual, que es recurrir a ellos cuando se presentan los problemas. El mantenimiento preventivo es dentro de un laboratorio, industria, etc., la base para evitar males mayores. Siempre es mejor prevenir que curar, en especial en mediciones clínicas. En la Tabla 24.2 se resumen estos aspectos:

**Tabla 24.2: Control Periódico de Equipos.**

Equipo	Procedimiento	Periodo	Límites de Tolerancia	Precauciones
Refrigerador	Registrar Temperatura	Diario	$(x \pm 1)^{\circ}\text{C}$	Limpieza mensual Descongelar cada 6 meses
Congelador	Registrar temperatura	Diario	$(x \pm 1)^{\circ}\text{C}$	Limpiar y descongelar cada 6 meses
Incubadora	Registrar temperatura	Diario	35 a 37 °C	Limpieza mensual
Incubadora CO <sub>2</sub>	Registrar temperatura y conc. de CO <sub>2</sub>	Diario	35 a 37 °C 5 % a 10 %	Limpieza mensual
Baño María	Registrar temperatura	Diario	36 a 38 °C	Limpieza mensual
Placa de Calentamiento	Registrar temperatura	Diario	$(x \pm 1)^{\circ}\text{C}$	Limpiar cada vez que se use
pH ( medidor )	Solución Calibradora	Cada vez que se use	$x \pm 0.1$	Limpiar cada vez que se use
Autoclave	Esporas de <i>B. Stearot</i>	Semanal	No Crecimiento	Limpieza mensual y agregar agua
Microscopio	Limpieza Correcta	Cada vez que se use		Mantenimiento general cada 6 meses
Jarra de anaeróbicos	Tira de azul de metileno	Cada vez que se use	De azul a blanco	Reactivo catalizador después de usarse y Cambio cada 3 meses
Centrífuga	Comprobar r.p.m.	Mensual	$x \pm x 0,05$	Inspección general y cada 6-12meses
Campana de Seguridad	Flujo de aire y luz UV	Cada seis Meses	45 a 55 pies / min.	Limpieza diaria, inspección general y mantenimiento anual
Medio Ambiente	Registrar temperatura	Diario	22 a 30 °C	Inspección general anual
Humedad	Registro	Diario	30 a 60 %	Evitar aparatos que la modifiquen

**Tabla 24.3: Período de uso de caja con medios de cultivos almacenados a 4°C.**

Medio	Refrigerador 4°C sin bolsa de plástico	Refrigerador 4°C con bolsa de plástico
Agar Sangre	15 días	50 días
Agar Chocolate	15 días	60 días
Agar Thayer-Martin	15 días	60 días
Agar Mueller-Hinton	15 días	70 días
Agar Mac Conkey	15 días	70 días
Agar EMB	15 días	70 días
Agar CLED	15 días	70 días
Agar Saboureaud	21 días	90 días
Agar de Manitol - Salt	15 días	60 días
Agar SS	6 días	10 días

**Tabla 24.4: Microorganismos usados en el control de calidad de medios de cultivos.**

Medio	Organismo Control	Incubación	Reacción Esperada
Agar sangre	<i>Streptococcus grupo A</i> <i>Streptococcus pneumoniae</i> <i>Listeria manocyctogen</i>	Aerobiosis 24 h	Crecimiento. Beta hemólisis Crecimiento. Alfa hemólisis Crecimiento. Beta hemólisis
Agar chocolate	<i>Haemophilus influenza</i> <i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Aerobiosis 24 h y CO <sub>2</sub>	Crecimiento Crecimiento
Agar Hektoen	<i>Salmonella spp.</i> <i>Escherichia coli</i>  <i>Shigelia spp.</i>	Aerobiosis 24 h	Colonias verdes, centro negro Col.Naranjas,crec. ligeramente inhibido Colonias verdes
Agar de DNAsa	<i>Serratia marcescens</i> <i>Enterobacter cloacae</i>	Aerobiosis 24 h	Zona clara (conHCl) Sin zona clara (R <sup>-</sup> )
Agar de EMB (Levine)	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i>	Aerobiosis 24 h	Crec. Brillo verde metálico Crecimiento. Sin color
Agar de MacConkey	<i>Escherichia coli</i> <i>Proteus mirabilis</i> <i>Enterococcus faecalis</i>	Aerobiosis 24 h	Crec.Colonias Rojas Crec. Sin color. No crec. No crecimiento
Agar de Manitol-salt	<i>Staphylococcus aureus</i> <i>Escherichia coli</i>	Aerobiosis 24 h	Crec. Colonias Amarillas No crecimiento
Agar SS Salmonella-Shigella	<i>Salmonella spp.</i>  <i>Escherichia coli</i>	Aerobiosis 24 h	Crec. No color. Centro Negro. No crecimiento
Agar de Thayer-Martin	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>  <i>Escherichia coli</i> <i>Staphylococcus aureus</i>	Aerobiosis 24 h y CO <sub>2</sub> Aerobiosis 24 h Aerobiosis 24 h	Crecimiento. Sin color  No crecimiento No crecimiento

## 24.6.1 Control de Calidad para exámenes bioquímicos

Si bien hay prácticas bioquímicas que se realizan en cajas con medios de cultivos, la mayoría se efectúan en tubos. Y por lo tanto, estos medios deberán ser sometidos a control en forma análoga a como se procede con las cajas. Por ejemplo algunas pruebas de identificación se realizan en cajas Petri como la prueba de Cap, la DNAsa, etc. Pero también se incluyen las supervizaciones de medios de diferenciación, formas de identificación, reveladores de reactivos y reactivos que puedan revelar actividad bacteriana. Los tres tipos de controles para los ensayos en tubos son análogos a los anteriores:

1) *Control de esterilidad*: Se realiza incubando a temperaturas entre 33 a 37 °C, durante 5 días, a un grupo de tubos seleccionados al azar del lote disponible. Se debe verificar que no haya ningún tipo de crecimiento.

2) *Control de fechas de caducidad*: Hay dos tipos de medios que pueden contener el tubo: agar o medio líquido. De eso depende la fecha de caducidad, según la forma de almacenamiento bajo diferentes condiciones. En la Tabla 24.5 se muestran los casos más comunes en agar y en líquido, los tipos de tapón, cerraduras y con sellos de seguridad.

3) *Control de calidad*: Se siembran dos tubos, con dos tipos de microorganismos que contienen el mismo caldo de cultivo o medios con agar. Los microorganismos se eligen para observar una diferenciación entre ambos, de manera tal, que uno genere una reacción típica y el otro no. Puede ser de distintas características fisiológicas o de crecimiento. Por caso, en el medio Lisina Descarboxilasa, una aerobiosis 24 hs con *Escherichia Coli* mostrará un crecimiento de color rojo. Mientras que *A. Calcoaceticus*, v *lwoffi* crecerá sin color rojo. En la Tabla 24.6 se muestra una lista de los microorganismos de control más frecuentes de la rutina diaria, sus características y sus reacciones típicas.

**Tabla 24.6 Organismos de Control para algunos medios en tubos –Exámenes Bioquímicos**

Medio	Organismo control	Incubación	Reacción Esperada
Arginina descarboxilasa	Enterobacter Cloacae Proteus mirabilis	Aerobiosis 24 hs	Crec. Color azuloso ( + ) Crec. Color amarillo ( - )
Citrato de Simmons	Klebsiella pneumoniac Escherichia coli	Aerobiosis 24 hs	Crec.color azul ( + ) No crec. Permanece verde ( - )
Fenilalanina ( Fe Cl3 )	Proteus mirabilis Escherichia coli	Aerobiosis 24 hs	Crec.Color verde ( + ) Crec. Color original ( - )
Indol ( Kovac' s )	Escherichia coli Klebsiella pneumoniac	Aerobiosis 24 hs	Crec.Color Rojo ( + ) Crec. Sin Color ( - )
Agar de Kligler	Escherichia coli Shigella flexeri Proteus mirabilis	Aerobiosis 24 hs	Acida en la superficie y profundo Alcalina en superficie y acida en profundo. Alcalina en superficie y profundo
Agar de Lisina-hierro	Salmonella typhimurium Shigella flexneri Proteus mirabilis	Aerobiosis 24 hs	Morado en superficie y profundo, H2S+ Morado en superficie y amarillo en profundo Fase sup. Roja, inf. Amarilla
Lisina Descarboxilasa	Salmonella typhimurium Shigella flexneri	Aerobiosis 24 hs	Crec. Color azuloso Crec. Color amarillo
Indol-Ornitina Motilidad Agar semisolido	Escherichia coli Klebsiella pneumoniac	Aerobiosis 24 hs	Mot. (+), Indol (+), Ornitina (+) Mot. (-), Indol (-), Ornitina (-)
Nitrato (Griess)	Escherichia coli A.Calcoaceticus, v. Twoffi	Aerobiosis 24 hs	Crec. Color Rojo Crec. No color rojo.
Dextrosa de O-F	Pseudomonas aeruginosas Aerobiosis Staphylococcus aureus A.Calcoaceticus, v. Twoffi	Aerobiosis 24 hs- 48 hs	Crec. Oxidativo ( o )  Crec. Fermentativo F Crec.Reacción alcalina
Azúcar triple-hierro	Shigella flexneri Citrobacter Pseudomonas aeruginosas	Aerobiosis 24 hs	Superficie alcalina ,ácido en profundo Superficie ácida y tubo H2S ( + ) Alcalina en superficie y tubo
Urea de Christensen	Proteus mirabilis Klebsiella pneumoniac Escherichia coli	Aerobiosis 24 hs	Rosa todo el medio Rosa solo en superficie Crec. Sin Color
Agar semi sólido Motilidad	Proteus mirabilis Klebsiella pneumoniac	Aerobiosis 24 hs	Crec.medio nebuloso ( + ) Crec. Sin borde ondulados ( - )
Vogues Proskauer Sin reactivo	Klebsiella pneumoniac Escherichia coli	Aerobiosis 24 hs	Crec. Color rojo Crec. Permanece color

Tabla 24.5: Período de usos de algunos agar y caldos de cultivos.

Medio	Tapón no hermético 4°C	Tapón no hermético	Cerradura hermética, en bolsa de plástico	Sello de seguridad
	Semanas	Temp. Ambiente Semanas	Temp. Ambiente Meses	Temp. Ambiente Meses
Caldo de Mueller-Hinton	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Infusión cerebro-corazón	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Caldo de Soya – Trypticase	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Caldo de Triptofano	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Caldo de nitrato	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Caldo de selenita	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Caldo de Tetrionato	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Caldo de Azúcar al 1%	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar inclinado	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar de Billis Esculina	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar de Fenilalanina	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar de Hierro-Lisina	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar Mot-Indol Ornitina	3 a 4	1	2 a 4	3 a 6
Agar de Mueller-Hinton	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar nutritivo	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar O-F	3 a 4	1	2 a 4	3 a 6
Agar sangre	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Agar triple azúcar –hierro	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6
Urea de Christensen	3 a 4	1 a 2	2 a 4	3 a 6

## 24.7 Problemas propuestos

- 1) Las cuatro partes de un sistema de medición son: ..... V F
- 2) Las sustancias de control son Patrones acuosos y sueros calibrados. V F
- 3) El suero control más conveniente se hace con suero de animales. V F
- 4) Lo más barato para hacer el control es usar un pool de sueros. V F
- 5) El protocolo es la parte del método de medición. V F
- 6) Las normas internacionales piden un año de estabilidad a los patrones liofilizados. V F
- 7) Los sueros control no deben estar contaminados con HIV I y HIV II. V F
- 8) En la fase pre-analítica del protocolo hay 9 puntos a tener en cuenta que son: .....
- 9) La repetibilidad de un método implica igual procedimiento, observador y equipos. V F
- 10) La reproducibilidad se refiere a mismos resultados en distintos momentos. V F
- 11) Para obtener la dispersión máx. admisible se pueden usar los criterios de Aspen. V F
- 12) La variabilidad biológica de una técnica es independiente de la edad del paciente. V F
- 13) Toda sustancia de control debe manipularse como si estuviera contaminada. V F
- 14) Cuando se efectúa una calibración por primera vez los 6 pasos a seguir son: .....
- 15) La exactitud de un método de medición se testea con el modelo de: .....
- 16) La precisión de un método de medición se testea con el modelo de:.....
- 17) Las hipótesis nulas para testear exactitud y precisión son: .....
- 18) El control de los equipos debe ser periódico. V F
- 19) Las esporas usadas para controlar un autoclave son las ....
- 20) Las incubadoras y baños maría deben limpiarse .....
- 21) Hay que descongelar cada semestre las: .....
- 22) Cada vez que se use hay que limpiar los medidores de pH y .....
- 23) Para los medios de cultivo se eligen al azar de un ... % a un ....% de los mismos.