

November 2015

ISSN 1650-3414

Volume 26 Number 4

eJIFCC

Communications and Publications Division (CPD) of the IFCC

Editor-in-chief : Prof. Gábor L. Kovács, MD, PhD, DSc

Department of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Pecs, Hungary

e-mail: ejifcc@ifcc.org

The
Journal of the
International
Federation of
Clinical
Chemistry and
Laboratory
Medicine



In this issue

Foreword of the editor Gábor L. Kovács	204
Prólogo del editor Gábor L. Kovács	206
Laboratory medicine in Latin America Rosa I. Sierra-Amor	208
El laboratorio clínico en América Latina Rosa I. Sierra-Amor	210
The XXII COLABIOCLI Congress María del Carmen Pasquel Carrera	212
XXII Congreso COLABIOCLI María del Carmen Pasquel Carrera	214
Quality management systems in the clinical laboratories in Latin America Alba C. Garzon	216
Sistemas de gestión en el laboratorio clínico en Latinoamérica Alba C. Garzon	221
External quality assessment schemes in Latin America Gabriel Alejandro Migliarino	226
Esquemas de evaluación externa de la calidad en América Latina Gabriel Alejandro Migliarino	238
Laboratory accreditation in Argentina María Amelia Acuña, Cesar Collino, Gustavo A. Chiabrandó	251
Acreditación de laboratorios clínicos en Argentina María Amelia Acuña, Cesar Collino, Gustavo A. Chiabrandó	255

In this issue

The accreditation experience of clinical laboratories and blood banks in Mexico Sandra Quintana	259
Experiencia en la acreditacion de laboratorios clinicos y bancos de sangre en Mexico Sandra Quintana	264
Experience of implementing ISO 15189 accreditation at a university laboratory Patricia Solis-Rouzant	270
Experiencia en la implementación de la acreditación ISO 15189 en un laboratorio universitario Patricia Solis-Rouzant	274
Quality control in screening for infectious diseases at blood banks. Rationale and methodology Amadeo Sáez-Alquezar, Pedro Albajar-Viñas, André Valpassos Guimarães, José Abol Corrêa	278
Control de calidad en el tamizaje para enfermedades infecciosas en bancos de sangre. ¿Por qué? y ¿cómo? Amadeo Sáez-Alquezar, Pedro Albajar-Viñas, André Valpassos Guimarães, José Abol Corrêa	286
Recent advances in the laboratory diagnosis of tuberculosis Rommy Teran, Jacobus H. de Waard	295
Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico Rommy Teran, Jacobus H. de Waard	310
Neonatal screening - its importance and impact in Latin America Graciela Queiruga	326
Pesquisa neonatal - porque es importante hacerla y su impacto en América Latina Graciela Queiruga	332
Book review – “Clinical Cases in Laboratory Medicine” Joseph B. Lopez	338

Foreword of the editor

Editor in Chief: Gábor L. Kovács, MD, PhD, DSc

The Communication and Publication Division of the IFCC and the editor of the eJIFCC decided to introduce to the readership major ongoing regional developments in the field of laboratory medicine in Latin America. As a unique exception, a bilingual issue (in English and Spanish) is presented hereby to help publicize the journal among laboratory specialists in Latin American countries. Two excellent laboratory scientists of the region, Dr. Rosa Isabel Sierra-Amor (Mexico) and Dr. Maria del Carmen Pasquel (Ecuador) were invited to guest co-edit this issue. In addition to collecting and editing the manuscripts, Rosa also translated most Spanish papers into English. On behalf of eJIFCC I take this opportunity to thank their valuable work.

Dr. Rosa Isabel SIERRA-AMOR is a clinical biochemist, with MSc and PhD degrees in physiology sciences from the Autonomous University of México, UNAM. She did a fellowship in biochemistry at the Department of Endocrinology and Metabolism, Jewish Hospital and Washington University School of Medicine in St. Louis, Mo., USA (1982) and a postgraduate course in clinical chemistry at the University of Reading, England (1986). From 1980 to 1990, she worked as Head of the laboratory, Nephrology and Mineral Metabolism Department, National Institute of Medical Sciences and Nutrition SZ in Mexico City; from 1990-2003, she was invited to direct the Bone and Mineral Metabolism Research

Laboratory at the Division of Neonatology, Department of Pediatrics, University of Cincinnati, and Children's Hospital Medical Center in Cincinnati, Oh., USA. Since 2004 she is board member of Laboratory LAQUIMS, S.C. and QC&QM Consultant.

In Mexico, she has collaborated closely with the Mexican Accreditation Entity as member of the National Assessment Panel, and former Board Member; she acted as external consulting member for the postgraduate program in clinical laboratory science at the University of Veracruz. With BIO RAD Mexico and Latin America, she initiated the International Conference on Quality with the auspices of IFCC (2006); she has lectured on laboratory accreditation, quality topics, and bone and mineral metabolism in Mexico, Latin America, and internationally; she is elected president of the Mexican Association of Clinical Laboratory Sciences (2015-2016). In the IFCC, she participated as member of the Executive Board of IFCC (1997-2002 and 2015-2017). She was member of the eJIFCC WG News, eJIFCC Editorial board, Awards Committee, and WG-IANT-RIA and National Representative from 1997-2011. At AACC Latin American WG she participates as member and chair (2015-2016), she was former AACC Treasurer, Materno-Fetal Division, former Chair Membership awards, Ohio Valley Section, and former member of the AACC International Relations Committee.

She served as Member in the WHO Laboratory Services Advisory Panel (1997-2001). Rosa was awarded with the Latin American Ames Award (1993), the AACC International Fellowship Award (1996), and by several other professional and health organizations in Mexico and in Latin America. She has published 27 papers, two book chapters, has served as reviewer of journals (POCT, Biochemia Medica, and Bioquimia), author and co-author of 78 abstracts, mentor of more than 20 post graduate and graduate students in laboratory medicine.

Dr. Maria del Carmen PASQUEL CARRERA is a pharmaceutical biochemist with a doctoral degree in biochemistry and pharmacy and a diploma in hematology from the Central University of Ecuador, Quito, Ecuador. She was assistant professor in the Department of Biochemistry (1984-1991). She has widespread activities in the scientific life of Ecuador; she was many times president of organizing committees of conferences, symposia, courses and workshop.

Lately, she was the president of Organizing Committee of the XXII Latin American Congress of clinical Biochemistry and Laboratory Sciences (COLABIOCLI) 2015, in Quito, Ecuador.

Maria is the past president of the Ecuadorian Society of Clinical Biochemistry of Pichincha (2009-2011), past vice president of Ecuadorian Society of Clinical Biochemistry National (SEBIOCLI, 2011-2013), past vice president of the College of Chemical and Biochemical Pharmaceutical in Pichincha (2011-2015). She is the correspondent of Ecuador in the "Radio el Microscopio" and the IFCC. She is the chair of the Latin America Working Group of Nomenclature and Translations of Publications and Communications Division of IFCC and the regional advisor of the Wiener Lab Foundation. She takes part in the scientific life of Ecuador as the member of the Technical Committee for Clinical Laboratories (SAE), as quality advisor of Consulting and Training CONCAP and general manager of Specialized Analysis Center (CEA).

Prólogo del editor

Editor: Gábor L. Kovács, MD, PhD, DSc

La División de Comunicación y Publicación de la IFCC y el editor del eJIFCC decidieron introducir a los lectores los principales acontecimientos regionales en el campo de laboratorio clínico en América Latina.

Como única excepción, esta edición bilingüe (en inglés y español) por este medio se presenta para ayudar a dar a conocer la revista entre los especialistas de laboratorio de los países de América Latina.

Dos excelentes científicas de laboratorio de la región, la Dra. Rosa Isabel Sierra-Amor (México) y la Dra. María del Carmen Pasquel (Ecuador) fueron invitados a ser co-editores huéspedes de este número. Además de reunir y editar los manuscritos, Rosa tradujo también varios de los artículos del español al inglés. En nombre del eJIFCC aprovecho esta oportunidad para agradecerles su valioso trabajo.

La Dra. Rosa Isabel SIERRA-AMOR, es Bioquímica Clínica, con Maestría y Doctorado en Ciencias Fisiológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México. Ella hizo una estancia en Bioquímica en el Departamento de Endocrinología y Metabolismo, del Hospital Jewish y la Escuela de Medicina de Washington University en San Luis Missouri, Estados Unidos (1982) y un curso de postgrado en química clínica en la Universidad de Reading, Inglaterra (1986). De 1980 a 1990, trabajó como Jefa del Laboratorio,

del Departamento de Nefrología y Metabolismo Mineral, en el Instituto Nacional y Ciencias Médicas Salvador Zubirán; de 1990 a 2003, fue invitada a dirigir el laboratorio de Investigación en Hueso y Metabolismo Mineral, de la División de Neonatología, Departamento de Pediatría, de la Universidad de Cincinnati, y del Hospital de Niños del Centro Médico de Cincinnati, Ohio en los Estados Unidos. Desde 2004, es miembro del comité directivo del Laboratorio LAQUIMS, S.C. y Consultor para CC/GC.

En México, ha colaborado muy cerca con la Entidad Mexicana de Acreditación como Miembro del Panel Nacional de Evaluadores, y ex miembro del Consejo directivo; ha sido consultor externo para el programa de postgrado en ciencias de laboratorio clínico de la Universidad Veracruzana. Con Bio Rad México y América Latina, inició el Ciclo Internacional de Conferencias de la Calidad con auspicios de la IFCC (2006 -); ella ha dado conferencias sobre acreditación de laboratorios, temas de calidad, y metabolismo óseo y mineral en México y América Latina, e internacionalmente; fue electa presidenta del Colegio Mexicano de Ciencias de Laboratorio Clínico (2015-2016). En la IFCC, ha servido como miembro del Comité Ejecutivo de la IFCC (1997-2002 y 2015-2017). Y ha participado como miembro del Grupo de Trabajo de Noticias del e-JIFCC, del comité editorial JIFCC, del Comité de Premios y del Grupo

de Trabajo IANT-RIA, y sido Representante Nacional de 1997-2011. En la AACC, participó como miembro y ahora coordina el Grupo de Trabajo Latinoamericano (2015-2016), fue Tesorero de la División de Pediatría y Materno-Fetal, presidente del Comité de Premios de la Ohio Valley Section, y del Comité de Relaciones Internacionales de la AACC. Ella también fue miembro del Panel de Consejeros de Servicios de Laboratorio de la OMS (1997-2001). Rosa recibió el Premio Latinoamericano Ames (1993), el Premio Internacional de la AACC (1996), y otros más de organizaciones de salud y profesionales en México y América Latina. Ha publicado 27 artículos científicos, dos capítulos de libros, y sido revisor de revistas científicas (POCT, Biochemia Medica, y Bioquímica), autor y co-autor de 78 trabajos libres, tutor de más de 20 alumnos de postgrado y licenciatura en laboratorio clínico.

Dra. María del Carmen PASQUEL CARRERA, es bioquímica farmacéutica con un doctorado en Bioquímica y Farmacia y un diplomado en Hematología de la Universidad Central del Ecuador. Ella ha tenido varias actividades en

la vida científica del Ecuador, ha sido presidente en varias ocasiones de comités organizadores de conferencias, simposia, cursos y talleres. Últimamente, fue presidenta del Comité Organizador del XXII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica y Ciencias de Laboratorio (COLABIOCLI) 2015 en Quito, Ecuador.

Maria es expresidenta de la Sociedad de Bioquímica Clínica de Pichincha (2009-2011), ex-vicepresidenta de la Sociedad Ecuatoriana de Bioquímica Clínica Nacional (SEBIOCLI, 2011-2013), expresidenta del Colegio de Química y Bioquímica Farmacéutica de Pichincha (2011-2015).

Es el corresponsal para Ecuador para el "Radio El Microscopio" y la IFCC. Es la presidenta del Grupo de Trabajo Iberoamericano de Nomenclatura y Traducciones de la División de Comunicación y Publicación de la IFCC, y es la consejera regional de laboratorio para la Fundación Wiener.

En la vida científica del Ecuador, ella es miembro del Comité Técnico para laboratorios clínicos (SAE), consultor de calidad del Consejo y Entrenamiento CONCAP y gerente general del Centro de Análisis Especializados (CEA).

Laboratory medicine in Latin America

Guest Co-editor: Rosa I. Sierra-Amor

eJIFCC Editorial Board Member

IFCC EB Member

President, Mexican Association of Clinical Laboratory Sciences, Mexico

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Dr. Rosa I. SIERRA-AMOR, PhD

LAQUIMS, S.C. Laboratory

Hernan Cortes no 989

Colonia Centro

CP 91700 Veracruz

Mexico

E-mail: rosa.sierra.amor@gmail.com

EDITORIAL

Latin America is a large region with a very diverse and complex laboratory environment. Resources are allocated very differently according to the health care system and interest of each government. Additionally, we must take into consideration that technology availability differs from country to country, and also from other parts of the world.

In general, there are three different levels of laboratory complexity going from small to mega laboratories. In addition, the laboratory is part of both, public and private sectors, the private part has a larger share though, where laboratory medicine is an essential part of patient care. In most of those laboratories, clinical chemistry, hematology, microbiology and urinalysis are the most common examinations done. However, university laboratories, research institutions and private organizations also contribute to the field, having highly specialized areas of research that fulfill the needs of the health care system.

With this issue, we are introducing the various aspects of laboratory medicine in Latin America. Articles are on a wide variety of topics including laboratory management, quality control, proficiency testing and accreditation. In this issue, Garzon's paper gives an

introduction of what is to be implemented in the quality management systems. Furthermore, Migliarino's paper describes the methodology to improve the precision and accuracy of tests, giving detailed information on some important requirements for the accreditation process. Acuña's experience, followed by Quintana's and Solis-Rouzant's paper is about implementing accreditation based on ISO 15189 in a general clinical laboratory and a university lab, confirming that, given institutional and professional cooperation, it is possible to do it in both settings. Regarding the very important emerging field of serological screening programs the article by Saez on infectious diseases in blood bank broadens the utility of laboratory medicine, and improves regional performance of these laboratory tests. Infectious diseases such as tuberculosis are a major worldwide health problem and

the paper by Teran and de Waard details the recent advances in the diagnosis of this disease from basic laboratory techniques to recent DNA technology that facilitates the identification of *M. tuberculosis*. Regarding the pediatric arena, Queiruga's description of the neonatal screening programs running in different countries, allows the audience to experience how this important field of laboratory medicine has been taken care of in Latin America from the 80's up till today. The opportunity to promote some aspects of laboratory medicine in Latin America through the eJIFCC is invaluable; having the opportunity to publish articles in both languages allows us to reach a substantial number of readers, furthermore, the eJIFCC is an important medium to disseminate our experiences to a global audience.

El laboratorio clínico en América Latina

Co-editor invitado: Rosa I. Sierra-Amor

Miembro del comité editorial eJIFCC

Miembro del Comité Ejecutivo de IFCC

Presidente del Colegio Mexicano de Ciencias de Laboratorio Clínico, México

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

Dr. Rosa I. SIERRA-AMOR, PhD

Laboratorio LAQUIMS, S.C.

Hernan Cortes no 989

Colonia Centro

CP 91700 Veracruz

México

Correo electrónico:

rosa.sierra.amor@gmail.com

EDITORIAL

América Latina es una región muy grande con un ambiente muy diverso y complejo en el laboratorio. Los recursos son dispuestos de manera diferente en el sistema de salud y en base a los intereses de cada gobierno, así como también, se debe considerar que la disponibilidad de la tecnología difiere de país a país, y también con el resto del mundo.

En general, hay tres niveles de complejidad en el laboratorio, que van desde el pequeño hasta el mega laboratorio. Además, el laboratorio forma parte de tanto el sector público como el privado, siendo este último muy grande, y donde el laboratorio clínico es una parte esencial del cuidado al paciente. En la mayoría de los laboratorios, las disciplinas más comunes son la química clínica, la hematología, la microbiología y el uroanálisis. Sin embargo, los laboratorios universitarios, las instituciones de investigación y las organizaciones privadas también contribuyen en este campo, pues cuentan con áreas altamente especializadas en investigación que llenan las necesidades del sistema de salud y del paciente.

Estamos introduciendo a nuestros lectores en este ejemplar, varios aspectos del laboratorio clínico en América Latina. Como pueden leer, hay artículos de

una gran variedad de tópicos, desde gestión del laboratorio, incluyendo control de calidad, programas de ensayos de aptitud, y acreditación. Al respecto, el artículo de Garzón, nos presenta la necesidad de implementar los sistemas de gestión de la calidad. Aún más, el artículo de Migliarino describe la metodología para mejorar la precisión y veracidad de las pruebas, dando información detallada de los requisitos para cumplir con el proceso de acreditación. La experiencia de Acuña, seguida de la de Quintana y Solís, sobre la implementación de la acreditación en base a ISO 15189 en un laboratorio clínico general y en uno universitario respectivamente, confirma que es posible hacerlo siempre que haya cooperación entre la institución y los profesionales. Muy importante campo inmerso en el laboratorio, es el programa de tamizaje serológico descrito por Saez para las enfermedades infecciosas en el banco de sangre y que abre al laboratorio clínico un aspecto más amplio en las pruebas que se realizan en

la región. Teniendo aún enfermedades conmutables como la tuberculosis, un problema de salud mundial, el artículo de Terán y Waard describe con detalle los recientes avances en el diagnóstico de esta enfermedad desde las técnicas básicas hasta la nueva tecnología del DNA que facilita la identificación del *M. tuberculosis*. En relación al área pediátrica, la descripción de Queiruga sobre los programas de tamizaje neonatal y como se realizan en diferentes países, le permite a la audiencia experimentar como se lleva a cabo este importante campo del laboratorio clínico en América Latina desde los 80's hasta el día de hoy. Interesante y gratificante ha sido el difundir algunos aspectos del laboratorio clínico en América Latina a través del e-JIFCC; tener la oportunidad de publicar en ambos idiomas nos permite abarcar un gran número de lectores, pero lo mejor de todo, lo más importante de esta tarea fue el informar a otros profesionales de nuestras experiencias.

The XXII COLABIOCLI Congress Quito 2015

Guest Co-editor: María del Carmen Pasquel Carrera

Central University of Ecuador

Chair, WG-IANT/CPD/IFCC

President, COLABIOCLI 2015 CONGRESS

ARTICLE INFO

Corresponding author:

María del Carmen Pasquel Carrera
The Central University of Ecuador
Chair, WG-IANT/CPD/IFCC
President, COLABIOCLI 2015 CONGRESS

PRESENTATION

The Latin American Confederation of Clinical Biochemistry known as COLABIOCLI was founded in 1968 during the First Latin American Congress of Clinical Biochemistry developed in the city of Mar del Plata - Argentina - as an initiative by a group of professionals belonging to the Federation of Specialists of Biological Analysis of the Province of Buenos Aires. On November 28th, 1973, five years later, during the II Latin American Congress, held in Porto Alegre, Brazil, COLABIOCLI was officially launched (IFCC Handbook 2015-2017, pp. 83-85).

The main objective of COLABIOCLI is to provide a better service to the community by the continuous training of biochemical and laboratory medicine professionals that would enhance ethical, scientific, technical development. These goals are achieved by promoting the organization of scientific events, as well as programs of external quality assessment schemes. Besides other relevant aspects, this is also highlighted in the main page of the COLABIOCLI website, addressed by its current President Dr. Carlos Daniel Navarro.

The National Ecuadorian Society of Clinical Biochemistry (SEBIOCLI) organized the XXII COLABIOCLI Congress

2015. This conference was sponsored by the IFCC, which supported four symposia and a workshop on traceability in laboratory medicine, being the analytical quality one of the major themes of the congress, including a round table discussion on laboratory accreditation based on ISO 15189 was presented.

The COLABIOCLI congress was an opportunity to obtain up-to-date knowledge. It provided the stage to improve agreement between scientific societies, universities and foundations with public services; furthermore, the latest technological advances were presented at the Diagnostic in vitro industry exhibition.



The COLABIOCLI CONGRESS 2015
Opening ceremony held on September 24th, 2015 at the JW Marriott Hotel Convention Center, Quito, Ecuador

XXII Congreso COLABIOCLI Quito 2015

Co-editor invitado: María del Carmen Pasquel Carrera

Universidad Central del Ecuador

Coordinador, WG-IANT, CPD, IFCC

Presidenta del Congreso COLABIOCLI 2015

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

María del Carmen Pasquel Carrera
Universidad Central del Ecuador
Coordinador, WG-IANT, CPD, IFCC
Presidenta del Congreso COLABIOCLI 2015

PRESENTACIÓN

La Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica (COLABIOCLI) se funda en 1968, en el transcurso del I Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica desarrollado en la ciudad de Mar del Plata, Argentina –como iniciativa de un grupo de profesionales pertenecientes a la Federación de Especialistas de Análisis Biológicos de la Provincia de Buenos Aires. El 28 de Noviembre de 1973, cinco años después, en el transcurso del II Congreso Latinoamericano, realizado en la ciudad de Porto Alegre, Brasil, esta idea se consolida y se constituye oficialmente. (IFCC Handbook 2015-2017, pp 83-85).

El principal objetivo de COLABIOCLI es el mejoramiento continuo de los profesionales bioquímicos y ciencias afines en sus aspectos éticos, científicos, técnicos y económicos, de esa forma se puede dar un mejor servicio a la comunidad. Apoyando este concepto promueve la organización de eventos científicos y gremiales, así como también programas de evaluación externa de calidad, entre otros aspectos relevantes, esto se destaca en la portada principal de la página web de COLABIOCLI, escrita por su actual Presidente Dr. Carlos Daniel Navarro.

La Sociedad Ecuatoriana de Bioquímica Clínica Nacional (SEBIOCLI) organizó el XXII CONGRESO COLABIOCLI

2015, que tuvo los auspicios de IFCC, y que apoyó con cuatro simposios y un taller sobre trazabilidad en laboratorio clínico, ya que uno de los temas principales del congreso fue la calidad analítica. También se organizó una mesa redonda sobre la acreditación en base a la norma ISO 15189.

Los congresos COLABIOCLI son una oportunidad para adquirir conocimientos y actualizarse. Generar convenios entre sociedades científicas, fundaciones con universidades y servicios públicos, y observar los últimos avances tecnológicos de la Industria de Diagnostico in vitro.



Autoridades de IFCC, COLABIOCLI, Comité organizador, Expositores extranjeros y jóvenes con trajes típicos en la foto oficial del CONGRESO COLABIOCLI 2015 en las Gradas de la Catedral Metropolitana de Quito-Ecuador

Quality management systems in the clinical laboratories in Latin America

Alba C. Garzon

ACG Quality Control, University of Bogotá, Colombia

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Dr. Alba Cecilia Garzon
Street 99 N. 71-21
Bogotá, Colombia
Phone: (571) 3143585870
E-mail: albacgarzon@hotmail.com
Web: www.acgcalidad.com

Key words:

system quality, insurance, reliability process

ABSTRACT

The implementation of management systems in accordance with standards like ISO 9001:2008 (1,2) in the clinical laboratories has conferred and added value of reliability and therefore a very significant input to patient safety. As we know the ISO 9001:2008 (1) a certification standard, and ISO 15189:2012 (2) an accreditation standard, both, at the time have generated institutional memory where they have been implemented, the transformation of culture focused on correct execution, control and following, evidence needed and the importance of register.

INTRODUCTION

In the last decades, in the health sector but especially in the clinical laboratories, the implementation of management systems under requirements of international standards has increased and improved the knowledge and functioning of processes with increasing the results, information and data which provide to the health care process and help to enhance the quality of life and generate a positive impact in health facility in terms of costs (decrease the need of unnecessary diagnostic procedures).

Likewise, the management system has been a tool, which has improved its operative and technical processes and adopted systemic methodologies for resolving problems on a day to day basis and give answers to questions in the actual context, where the quality and security of the results is increasingly under scrutiny.

QUALITY MANAGEMENT SYSTEMS

In the past 2 decades, Latin-American professionals of clinical laboratory have focused their efforts to meet demands of patients, the requirements from the clinicians and regulatory organisms, and have focused on implementing international certified standards, for example the ISO 9001:2008 (1, 2). Despite limited resources, professionals of clinical laboratory have worked relentlessly to implement management systems for the achievement of organizational goals. Today, in the XXI century, in the year 2015, we understand that the management system helps answer the needs of a process and have been flexible, dynamic, and simple with contribution to the organization in order to achieve an internal balance that guarantees sustainability. It has been realized that implementation of quality management benefits patient care, and it may not be promptly evident, but such an investment results in long-term sustainability.

The management of quality can be defined as a set of activities that is developed with which an organization can operate and promotes fulfillment of its mission and reach its vision, through a systemic methodology that permits continual improvement under excellent planning of all its processes, including execution and verification. The implementation of corrective and preventive actions is a must; the subsequent improvement is evidence of organizational learning. It is the authors' personal experience of 20 years in implementing quality managements systems that the eventual end benefactor is the patient.

MANAGEMENT SYSTEMS—ISO 9001:2008 AND ISO 15189:2012 STANDARDS

In Latin-America, for many years, the clinical laboratories implemented the ISO 9001:2008 (1) standard for their management system, this constituted a true challenge because this standard is not specific for clinical laboratory processes and in some requirements was short in the “must” for the particularities of laboratory. However, the model was implemented and with the ISO 9001:2008 (1) our laboratories gained experience with registry, methodology for documenting their procedures, control mechanism and follow-up. They implement very important components like program of internal audits that result in management indicators; these are elements that were not materialized in the ISO standards. Additionally, with the follow-up of measuring instruments, for first time, the phrase “metrology” is real in the clinical laboratories and inside the language of our professionals, the traceability, calibration, reference materials are part of the day to day procedures of all laboratories (3).

The significant lapses of the ISO 9001:2008 (1) were soon clear to all. The ISO 15189:2012 (2) specific standard for quality requirements and competence for clinical laboratories is

widely delineated. The accreditation for our quality management system in clinical laboratories with conformity to quality requirements and competence of ISO 15189:2012 (2) standards is a real context and the correct way for us that we have been committed with the quality of results and security of the process in clinical laboratory. This standard ISO 15189:2012:2012 (2) implies a system of management of quality with risk approach; this guarantees migration from a reactive approach to a preventive and proactive model. With the exhaustive incorporation of “musts” toward patient security, identification of technology risks and reactivity, we have succeeded in confirming to the global guidelines of the World Health Organization (WHO) as regards to patient security, techno vigilance, and reactive vigilance and hemovigilance as applicable. In terms of clinical effectiveness, it streamlines the responsibility of clinical

laboratory in the notification of critical results, definition, communication and impact measurement, as well as tied all the aspects related with the information system and the mechanisms of verification, control and security of auto verification process or auto validation through mild ware; this was beyond contention in previous versions. Additionally, the requirement of validation/verification/evaluation of methods, insurance of quality, the obligation to participate in programs with other laboratories accredited with ISO 17043 (4) the need of measure the uncertainty e.g., parameter of exactness in the result, have been the challenge in the academy for our analysts and has generated an improvement of competences. As such, today we have the professionals of best domain and empowerment, not only in statistical tools but also in knowledge of assay tools and control of variables.

Table 1 Laboratory certification and accreditation in Latin American countries

Country	Certification body	Accreditation body	Certification	Accreditation	
			9001:2008	17025:2005	15189:2012
Argentina	IRAM (Instituto Argentino de Normalización y certificación)	OAA (Organismo Argentino de Acreditación)	46	143	8
Bolivia	IBNORCA (Instituto Bolivariano de Normalización y calidad)	NAI	8	NAI	NAI
Brazil	ABNT	cgcre / INMETRO	10	4260	NAI
Chile	INN	INN (Instituto Nacional de Normalización)	NAI	1109	15
Colombia	ICONTEC	ONAC	89	191	6

Costa Rica	INTECO	ECA (Ente Costarricense de Acreditación)	5	73	5
Cuba	NAI	ONARC (Organismo Nacional de Acreditación de la República de Cuba)	3	NAI	NAI
Ecuador	INEN	SAE (Servicio de Acreditación Ecuatoriano)	NAI	NAI	NAI
El Salvador	CONACYT	OSA (Organismo Salvadoreño de Acreditación)	NAI	NAI	NAI
French Guyana	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
Granada	NAI	NAI	NAI	NAI	NAI
Guatemala	COGUANOR. NE	OGA (Oficina Guatemanteca de Acreditación)	NAI	NAI	NAI
Mexico	IMNC (Instituto Mexicano de Normalización y certificación)	EMA (Entidad mexicana de acreditación)	NAI	23000	127
Paraguay	INTN	ONA (Oficina Nacional de Acreditación)	NAI	17	NAI
Panama	COPANIT	CNA (Consejo Nacional de Acreditación)	NAI	NAI	NAI
Peru	INDECOPI	INDECOPI	NAI	58	NAI
Uruguay	UNIT	OUA (Organismo Uruguayo de Acreditación)	NAI	24	3
Venezuela	FONDONORMA	SENCAMER	2	35	NAI

* NAI: Not available information

CONCLUSION

The management systems have contributed significantly to decrease the variability of procedures through the standardization and the possible use of means available with eventual benefit to patient care. Added to this, the goal that is possible, visible and quantifiable in the transformation towards the culture of improved quality and security of patient care. The actions towards continued improvement, the search of excellence and zero mistakes is invaluable for attainment of precise information to professionals in this discipline.

REFERENCES

1. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos. Tercera Actualización 2008-11-18
2. ISO 15189:20012: Medical Laboratories- Requirements for quality and competence. Third Edition 2012-11-01.
3. Calidad Analítica en el Laboratorio Clínico Gestión y Control versión II. Alba C Garzón G. Editorial: ACG LTDA, Segunda Edición-Bogotá 2010. Colombia.
4. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC/IEC 17043: Evaluación de la Conformidad. Requisitos generales para los ensayos de Aptitud. Editada 2010-09-27.

Sistemas de gestión en el laboratorio clínico en Latinoamérica

Alba C. Garzon

Control de Calidad ACG, Universidad de Bogotá, Colombia

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

Dra. Garzon, Alba Cecilia
Street 99 N. 71-21
Bogotá, Colombia
Teléfono: (571) 3143585870
Correo electrónico: albacgarzon@hotmail.com
Web: www.acgcalidad.com

Palabras clave:

sistema, calidad, aseguramiento,
confiabilidad, procesos

RESÚMEN

La implementación de sistemas de gestión de calidad dando conformidad a normas como la ISO 9001:2008 (1,2) en los laboratorios clínicos ha conferido un valor agregado de confiabilidad y por lo tanto un aporte muy significativo a la seguridad del paciente. Si bien la norma ISO 9001:2008 (1) es una norma de certificación y la norma ISO 15189:2012 (2) es una norma de acreditación, las dos en su momento, y en donde han sido implementadas han generado memoria institucional, una transformación de la cultura centrada en la ejecución de lo correcto, en el control y el seguimiento, en la necesidad de la evidencia, y la importancia del registro.

INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas en el sector salud pero especialmente a nivel de los laboratorios clínicos la implementación de sistemas de gestión de la calidad bajo requisitos de normas internacionales ha aumentado y mejorado el conocimiento y funcionamiento propio de los procesos con un incremento de los resultados, datos e información que aportan al proceso asistencial y que contribuyen a mejorar la calidad de vida y adicionalmente generan un impacto positivo dentro de la estructura sanitaria en términos de costos, al disminuir la necesidad de procedimientos diagnósticos innecesarios, o no requeridos, solicitados por resultados de baja calidad.

Igualmente han sido una herramienta que les ha facilitado mejorar sus procesos operativos y técnicos así como adoptar metodologías sistemáticas para resolver problemas que aparecen cada día, cubrir y dar respuesta a las necesidades que se plantean en nuestro contexto actual cada vez más demandante de calidad y seguridad en los resultados.

SISTEMA DE GESTIÓN DE CALIDAD

En Latinoamérica en los últimos 20 años, los profesionales del laboratorio clínico han centrado sus esfuerzos por superar con éxito el reto diario de satisfacer las necesidades de atención de sus pacientes, las exigencias por parte de los médicos y de los organismos regulatorios, utilizando para ello como herramientas la implementación de normas internacionales certificables como la ISO 9001:2008 (1, 2). A pesar de los recursos limitados, común denominador del sector salud, y gracias a la tenacidad de los profesionales del laboratorio, la implementación de los sistemas que hace unos años era un objetivo, hoy en una América Latina más madura, se ha entendido que son una herramienta y no el fin; que son el vehículo que permite el logro

de los objetivos organizacionales. Hoy en el siglo XXI año 2015, ya entendimos que el sistema de gestión de calidad debe dar respuesta a las necesidades de los procesos, y que debe ser tan flexible, tan dinámico y tan simple que le aporte a la organización la información para poder con base en el aprendizaje organizacional de su día a día, lograr un equilibrio interno que le garantice su sostenibilidad y permanencia en un entorno tan cambiante, y tan dinámico, como adverso en lo que a estructuras económicas se refiere. Para todos es claro que el retorno de una implementación centrada en la mejora en el paciente y en su seguridad, no es inmediato, como lo esperan los administradores, pero que en el mediano y en el largo plazo, son la única herramienta que de verdad genera cambios en el genoma de la organización, y así contribuyen a su sostenibilidad financiera y permanencia en el tiempo y en el espacio.

La gestión de la calidad puede definirse como el conjunto de las actividades que desarrolla la organización para facilitar la operación de su política de calidad y dar cumplimiento a su misión y llevar la organización a alcanzar el logro de su visión, mediante una metodología sistemática que la lleva hacia el mejoramiento continuo, soportado en una excelente planificación de su procesos, ejecución, verificación y accionar sobre los mismos. Este paso que implica la implementación de acciones correctivas, preventivas y de mejoramiento es la evidencia específica del aprendizaje organizacional. Y ésta es la mayor ganancia para una organización, porque es lo único que genera cultura, y la cultura es lo único de las organizaciones que es permeable a sus pacientes. La cultura del servicio, la cultura del mejoramiento, la cultura de la seguridad, la cultura de la humanización (3).

SISTEMAS DE GESTIÓN DE CALIDAD NORMAS ISO 9001:2008 E ISO 15189:2012

En Latinoamérica, durante muchos años, los laboratorios clínicos implementaron la norma ISO 9001:2008 (1) para su sistema de gestión de calidad por procesos, lo que se constituyó en un verdadero reto, ya que la norma como tal por no ser específica para los procesos del laboratorio, en algunos requisitos, era limitada en la especificidad de los deberes, para las particularidades propias del laboratorio. Sin embargo el modelo se implementó, y con la ISO 9001:2008 (1) nuestros laboratorios ganaron cultura del registro, metodología para documentar sus procesos, mecanismo de control y seguimiento, e implementaron componentes tan importantes como el programa de auditorías internas, y dieron a luz los indicadores de gestión. Elementos que antes de las normas ISO, no se materializaban con esa definición a nivel del laboratorio. Adicionalmente, con el seguimiento a los equipos de medición por primera vez el tema “Metrología” toma vida en el seno de los laboratorios. Y en el lenguaje de los profesionales, estos términos como son la trazabilidad, la calibración, los materiales de referencia, entraron a formar parte de nuestro día a día.

Para todos era claro, que la ISO 9001:2008 (1) tenía un vacío significativo: “COMPETENCIA”. Es así como la ISO 15189:2012 (2) norma específica para los requisitos de calidad y competencia de los laboratorios clínicos se pasea aun tímida y recatada por nuestro continente Latinoamericano. La acreditación del sistema de gestión de calidad de los laboratorios clínicos de conformidad a los requisitos de calidad y competencia de la ISO 15189:2012 (2) es ya una realidad y es el camino correcto, de todos los que

estamos por convicción comprometidos con la calidad de los resultados y la seguridad del proceso de prestación del servicio de laboratorio clínico. ISO 15189:2012 (2) implica un sistema de gestión de calidad con enfoque de riesgo, lo que garantiza migrar de una cultura reactiva a un modelo completamente preventivo y proactivo. Con la incorporación taxativa de los deberes hacia seguridad de pacientes, identificación de riesgos en tecnología y reactivos, se articula perfectamente a las directrices mundiales de la Organización Mundial de la Salud (OMS), sobre la seguridad del paciente, la tecnovigilancia, la reactivo-vigilancia y la hemovigilancia cuando aplique. En términos de efectividad clínica fortalece la responsabilidad del laboratorio en la notificación de resultados críticos, su definición, comunicación y medición del impacto, así como amarra todo los aspectos relacionados al sistema de información, y a los mecanismos de verificación, control y seguridad en los procesos de auto-verificación o autovalidación a través de middleware, que estaban fuera del radar en versiones anteriores (3). Adicionalmente la exigencia de validación/verificación/evaluación de métodos, el aseguramiento de la calidad, la obligatoriedad de participar en programas de ensayos de aptitud o inter-laboratorios acreditados con ISO 17043:2010 (4) la necesidad de estimar la incertidumbre como parámetro de exactitud de los resultados, ha sido un reto en lo académico para nuestros analistas, que ha generado un mejoramiento de sus competencias, y gracias a ellos hoy contamos con profesionales de mayor dominio y posicionamiento, no solo en herramientas de tipo estadístico, sino además en el concomitamiento de sus métodos de ensayo y en el control de sus variables.

Cuadro 1 Estado de países Latinoamericanos con certificación y acreditación

País	Ente certificador	Ente acreditador	Certificación	Acreditación	
			# Lab certificados con 9001:2008	# Lab acreditados con 17025:2005	# Lab acreditados con 15189:2012
Argentina	IRAM (Instituto Argentino de Normalización y certificación)	OAA (Organismo Argentino de Acreditación)	46	143	8
Bolivia	IBNORCA (Instituto Bolivariano de Normalización y calidad)	NHID	8	NHID	NHID
Brasil	ABNT	cgcre / INMETRO	10	4260	NHID
Chile	INN	INN (Instituto Nacional de Normalización)	NHID	1109	15
Colombia	ICONTEC	ONAC	89	191	6
Costa Rica	INTECO	ECA (Ente Costarricense de Acreditación)	5	73	5
Cuba	NHID	ONARC (Organo Nacional de Acreditación de la República de Cuba)	3	NHID	NHID
Ecuador	INEN	SAE (Servicio de Acreditación Ecuatoriano)	NHID	NHID	NHID
El Salvador	CONACYT	OSA (Organismo Salvadoreño de Acreditación)	NHID	NHID	NHID
Guayana Francesca	NHID	NHID	NHID	NHID	NHID

Granada	NHID	NHID	NHID	NHID	NHID
Guatemala	COGUANOR. NE	OGA (Oficina Guatemanteca de Acreditación)	NHID	NHID	NHID
México	IMNC (Instituto Mexicano de Normalización y certificación)	EMA (Entidad mexicana de acreditación)	NHID	23000	127
Paraguay	INTN	ONA (Oficina Nacional de Acreditación)	NHID	17	NHID
Panamá	COPANIT	CNA (Consejo Nacional de Acreditación)	NHID	NHID	NHID
Perú	INDECOPI	INDECOPI	NHID	58	NHID
Uruguay	UNIT	OUA (Organismo Uruguayo de Acreditación)	NHID	24	3
Venezuela	FONDONORMA	SENCAMER	2	35	NHID

* NHID: No hay información disponible

CONCLUSIÓN

Los sistemas de gestión de calidad, han contribuido significativamente a disminuir la variabilidad de los procesos mediante la estandarización, así como la mejor utilización posible de los medios disponibles en beneficio del paciente, sumado a un logro que ya es visible y cuantificable en la transformación hacia la cultura del mejoramiento, la cultura de la calidad y la seguridad en el paciente. El movimiento hacia la mejora continua, la búsqueda de la excelencia y el cero error no tiene retorno en los laboratorios clínicos de América Latina, y es invaluable el aporte de los profesionales de esta disciplina en

su implementación, mantenimiento y mejoramiento, siempre sin perder la esencia: nuestros pacientes.

BIBLIOGRAFÍA

1. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC-ISO 9001:2008: Sistemas de Gestión de la Calidad. Requisitos. Tercera Actualización 2008-11-18
2. ISO 15189:2012: Medical Laboratories- Requirements for quality and competence. Third Edition 2012-11-01.
3. Calidad Analítica en el Laboratorio Clínico Gestión y Control versión II. Alba C Garzón G. Segunda Edición-Bogotá 2010.Editoral: ACG LTDA Colombia.
4. NORMA TÉCNICA COLOMBIANA NTC/IEC 17043: Evaluación de la conformidad. Requisitos Generales para los Ensayos de Aptitud. Editada 2010-09-27.

External quality assessment schemes in Latin America

Gabriel Alejandro Migliarino

Gmigliarino Consultants, Buenos Aires, Argentina

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Gabriel Alejandro Migliarino, Biochemist
Director at Gmigliarino Consultores
Carlos Tejedor 1323 1 A
1706 Haedo, Buenos Aires, Argentina
Phone: +54 11 4460 2527
E-mail: gmigliarino@gmigliarino.com

Key words:

PT, EQA, assigned value, standard deviation,
assigned value standard uncertainty,
comparison group, performance, intended use

ABSTRACT

As professionals of the clinical laboratory we must generate clinically useful results, products and services for the patients' health care. Laboratories must participate in one or more proficiency testing (PT) or external quality assessment (EQA) programs as part of routine quality assurance. Nevertheless participating per se is not enough. There are critical factors to take into consideration when selecting a PT or EQA providers. In most cases the survey's providers offer assigned values obtained from consensus of results provided by the participants for comparison, it is critical to evaluate consistency of the comparison group before interpretation and decision-making.

As far as possible, one must participate in schemes accredited under the ISO 17043 [4] regulations or those that substantially comply with their guidelines. It assures a correct statistical treatment of data through robust statistical techniques like those proposed by ISO 13528 [5], these provide necessary information for evaluation of consistency of the group dedicated for comparison. In Latin America, the External Quality Assessment programs participation rate is not high. Providers of local schemes face difficulties putting together comparison groups due to multiple reagents and instruments from different commercial

brands. It results in non-consistent comparison groups due to the small number of participants. Besides, in general the attitude of laboratories is reactive instead of proactive. They tend to pay more attention to rejected results than to accepted ones. At the same time, it is not common practice that laboratories evaluate the latest survey with previous ones. In conclusion, the information offered by these schemes is underused and there is a lot of work to carry out.

INTRODUCTION

The main objective of the clinical laboratory is to yield results, products and services clinically useful health care. Laboratories must participate in one or more Proficiency testing (PT) PT or External Quality Assessment (EQA) programs as part of routine quality assurance [1].

These schemes evaluate the laboratory's analytical performance compared to its peers (other laboratories using the same method and instrument), reference standards and/or reference laboratories [2].

These schemes are designed to monitor the laboratory performance in a retrospective manner using "blind" samples analyzed as if they were patient samples. The results are sent to the scheme organizer on a timely manner for statistical analysis; each laboratory will then receive a report comparing its performance with those of other participants of the same program. These schemes provide an external validation of the laboratory results and also constitute a valuable tool for the internal monitoring of the laboratory performance. This usually benefits the laboratory, its clients and furthermore the accreditation and/or regulation agencies.

Using these schemes as a tool for internal monitoring is not limited to the investigation of unacceptable results. Monitoring of all results (accepted and rejected), always evaluating the latest survey against previous ones, enables the

laboratory to identify deviations and tendencies which generate a disqualification, as such exposing potential problems related to the presence of a significant random error, a significant systematic error or even a human error.

The evaluation of the comprehensive report (summary) allows one to get insight into measurement techniques that may well be favored over others that may not have reported satisfactory analytical performance. Exhaustive reporting enables identification of differences among different measurement procedures for the same analyte, significant systematic error or issues related to poor reproducibility.

Traditional schemes (PT/EQA) tend to address only the analytical procedure (examination procedures), but some innovative schemes have recently been introduced to evaluate the pre-analytical activities as well as the post-analytical activities of the clinical laboratory [3].

It is also important to bear in mind that each scheme (PT/EQA) has limitations and that it is no appropriate using these schemes (PT/EQA) alone to evaluate laboratory quality. Therefore, it is necessary to underline that internal quality control (IQC), PT/ EQA and other methods must be utilized to supervise and improve clinical laboratory performance.

WHAT IS THE DIFFERENCE BETWEEN EQA AND PT?

Nowadays, definitions of external quality assurance programs (EQA) and proficiency test programs (PT) are indiscriminately used as valuable tools for the clinical laboratories services quality improvement [2]. Anyways, the main objectives of EQA are educational and can be supported by complementary elements like specific plans designed to extend the evaluation along all the steps of the test cycle, including the results interpretation. ISO / IEC 17043 Standard [4] refers on its development to the proficiency tests

but mentions the particularities of the external quality assessment programs applied on the clinical area: *“Some providers of Proficiency Testing (PT) in the medical area use the terms external quality assessment (EQA) for their proficiency tests programs, for wider programs, or for both”.*

At the same time ANNEX A (A.4) of the same standard states: *“EQA programs (such as those provided for clinical laboratory testing) offer a variety of programs for interlaboratory comparisons based on this traditional method of proficiency testing but with a wider application of the programs. Many EQA programs are designed to evaluate the volume of work of the laboratory and not only the testing process. Most EQA programs are on-going programs including a long term follow up of a laboratory performance. A typical characteristic of the EQA programs is that they instruct the participants and foster quality improvement. Comments of advisory an educational status is part of the report delivered to the participants aiming at this end”.*

According to a widely accepted definition, PT's are programs to evaluate the participants' performance concerning previously established criteria through interlaboratory comparisons [4]. A PT is a program by which multiple samples are regularly sent to the members of a group of participant laboratories for their analysis and/or identification. Each of the results informed by the laboratory is compared with those from other laboratories belonging to the same group or with an assigned value for a valid procedure.

STATISTICAL TREATMENT OF DATA

The results of the PT/EQA programs may be of many different formats, covering a wide range of data and following different statistical distributions. It is important that the design used by the provider of the PT/EQA is appropriate for the type and purpose of the PT/EQA scheme it is

organizing. Additionally, the design the PT/EQA provider uses must be thoroughly described to the participants. The preferred statistical techniques are those described on ISO 13528 Standard [5], although other valid approaches may be used [13].

The main statistical approaches used on PT/EQA programs are based on the normal distribution of data. However, it is common that, even though the set of results of the participants essentially reflect a normal distribution, at both ends of the distribution they are contaminated by a small proportion of extreme values. The original approach used by the PT/EQA providers (and still used by some PT/EQA programs) was using statistical testing to identify the presence of extreme values in the original data set. However, the most common approach currently used by PT/EQA providers, recommended by the ISO 13528 Standard [5], is using robust statistics [14, 15]. Robust statistics have the advantage of reducing the contribution of extreme values to calculated statistical parameters like the median and the standard deviation. A series of models apply robust statistics. Some of which are described by the ISO 13528 Standard [5].

One of the basic elements of any PT/EQA program is the performance evaluation of each participant. To this end, the PT/EQA program provider must basically establish two values, used to evaluate performance:

- Assigned Value
- Standard Deviation of the comparison group in the scheme

Additionally, the PT/EQA program provider is expected to offer a measurement uncertainty estimation associated to the assigned value and a statement of its metrology traceability when possible. This concept has been included on the ISO / IEC 17043 Standard [4]. The relevance, necessity and feasibility of this estimation will be determined by the PT/EQA scheme design.

Different methods can be used to establish these values [5, 16, 35]. To date there is no standardization or agreement as to which protocol to apply. The statistical design must be documented by the PT/EQA program provider and must be taken into account at the time of choosing a PT/EQA scheme. Knowing the measurement uncertainty associated with the estimation of the assigned value will be relevant at the time of evaluating how reliable the comparison group offered by the PT/EQA program is.

Assigned value

Essentially, there are, as described by the ISO 13528 Standard [5], five methods available to obtain the assigned value and its typical associated uncertainty:

1. Formulation
2. Certified reference materials
3. Reference values
4. Consensus values provided by a group of expert laboratories
5. Consensus value obtained from the participants

Using a consensus value, produced in each round of the PT/EQA program, based on the results obtained from the participants is widely spread along the clinical laboratory area (option 5). The consensus value is often estimated using robust statistical techniques. The consensus approach is clearly the most simple and, sometimes, for example, as it uses natural matrix samples, it is frequently the only way to establish an estimation of the actual value [31, 32].

As expected, this model has its limitations:

- a. A real consensus among the participants may not exist;
- b. The consensus may be biased by the general use of a flawed methodology and this bias will not be reflected on the standard uncertainty of the assigned value.

Standard deviation of the comparison group in the scheme

As described by the ISO 13528 Standard [5], there are essentially five approaches to determine the standard deviation of the comparison group in the PT/EQA that will be used to establish the acceptable range of the participants' results:

1. Prescribed value.
2. Perception.
3. Based on a general model.
4. Based on the results of a precision experiment.
5. Based on the data obtained from a round of a PT/EQA scheme.

As expected, at the clinical laboratory environment most of the providers of PT/EQA schemes resort to this last option (option 5). With this approach, the standard deviation to evaluate the PT/EQA program used in a round of a scheme derives from the results reported by the participants in the same round. It will be the robust standard deviation of the results reported by all the participants.

A disadvantage of this approach is that the value may substantially vary from one round to the other. This variation makes difficult the follow up by the laboratory of the standard deviation index (Z score) along different rounds in search of deviations and tendencies [13].

Measurement uncertainty associated to the assigned value estimation

As already mentioned, the PT/EQA programs for Clinical Laboratories providers generally resort to the participants consensus to obtain the assigned value and the standard deviation of the comparison group. In other cases, providers of PT/EQA programs resort to simpler statistic models, not based on robust statistics techniques [33].

We will work on an assigned value and a standard deviation established from the participants' consensus, using robust statistics techniques [40] like those described by ISO 13528 [5].

The uncertainty associated to the assigned value is calculated as (equation 1):

$$u(x_{pt}) = 1,25 \times S^* / \sqrt{p}$$

Equation 1

Where:

$u(x_{pt})$: Uncertainty associated to the estimation of the assigned value in the round

S^* : Robust Standard Deviation of the group of participants in the round

p : Amount of participants of the comparison group in the round

CRITICAL ASPECTS AT THE TIME OF SELECTING AN EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT PROGRAM (EQA) OR A PROFICIENCY TESTING PROGRAM (PT)

We will evaluate critical aspects to take into account at the time of selecting an external quality assessment program. Not all the external quality assessment schemes offer the same. ISO 15189 [1] Standard states: *"It is recommended that the laboratory participates in external quality assessments programs which substantially comply with the relevant requirements of the ISO/IEC 17043 Standard [4]."* It is worth mentioning that the statistical treatment of data proposed by this standard complies with what ISO 13528 Standard establishes [5].

The critical aspects we are going to take under consideration (figure 1) are dealt with by these two standards [4,5].

Let's remember that a PT/EQA survey is carried out by sending a sample or set of samples by an organizer entity to a participant laboratory. The laboratory must process the samples in the

same manner it will do with routine samples, namely, as far as possible as if they were patients' samples. (Fig. 1)

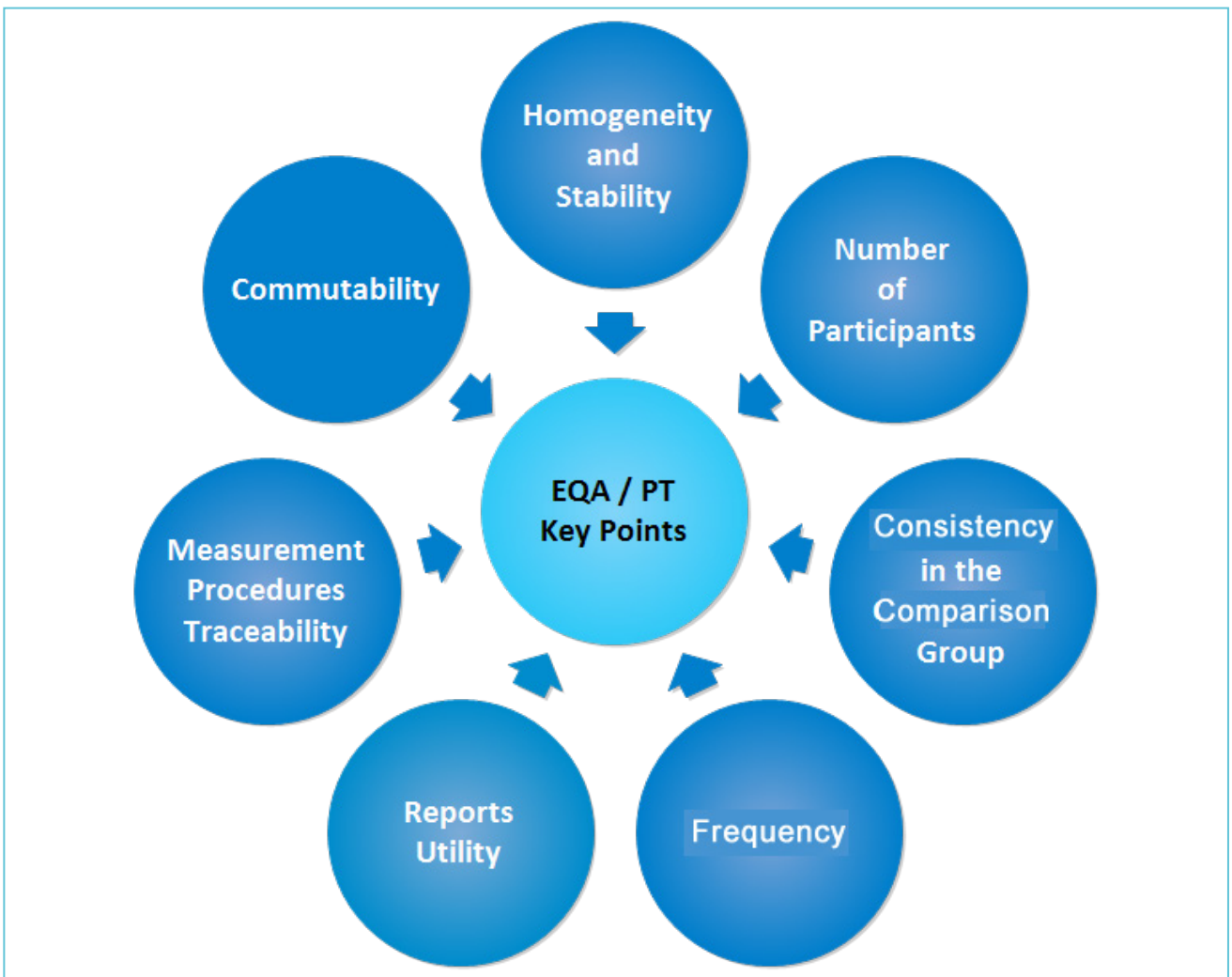
Traceability of the measurement procedures

A primary objective is to achieve that the obtained results over the same sample at comparable times in different laboratories using different measurement procedures are equivalent, within clinically significant limits, to enable optimal use of clinical practice guidelines to diagnose illnesses and an optimal patient's health care. When the results are obtained from non-standardized or harmonized measurement procedures, in different laboratories, it is expectable that their numerical value will be different or even, it is expectable that their clinical interpretation will be different.

Currently, standardization and harmonization of measurement procedures (traceability of calibration) are based on traceability criteria described in ISO 17511 [9], including five categories of reference systems. Categories 1, 2, and 3 stand for standardized measurement procedures. Category 4 stands for harmonized measurement procedures. In category 5 we find the measurement procedures where the manufacturer is solely responsible for the calibration traceability chain [6, 7, 8,17].

It is essential that clinical laboratories know the metrology traceability of their measurement procedures to group accurately in the PT/EQA programs. We must remember that most of PT/EQA program providers estimate the assigned value by the participant's results consensus of the comparison group. If we do not group correctly, it is very likely that the assigned value will not correspond to the best estimation of the true value of our measurement procedure taking into account its metrology traceability (Calibration Traceability).

Figure 1 PT/EQA key points



Commutability

The objective of the PT/EQA programs is to verify on a recurring basis that laboratory results comply with the quality requirements established according to the intended use of measurement procedures for the optimal patients' health care.

A key factor for the correct interpretation of the results of PT/EQA programs is the knowledge of the samples commutability and the procedure used to assign the true value for them. Commutable PT/EQA samples demonstrate the same numerical relationship among

different measurement procedures as the one expected for patients' samples. Non commutable PT/EQA samples present a bias, caused by matrix effects of unknown magnitude which limits the clinical interpretation of results [10, 11, 37, 41].

Concerning the commutability of the PT/EQA samples, ISO 17043 [4] states: *"It is convenient that the items proficiency testing coincide, in terms of matrix, measurand and concentrations, as much as is feasible, with the type of items or materials of the routine or calibration testing."*

Homogeneity and stability

Appropriate homogeneity and stability criteria must be established, based on the effect the absence of these characteristics would have on results and the evaluation of the participants' performance.

Sometimes it is not possible to submit the PT/EQA testing items to homogeneity and stability testing. An example would be when having limited material available to prepare the items for a PT/EQA testing. Sometimes the best available option is with materials which are not homogeneous or stable enough. In these cases, they still can be useful as PT/EQA testing items, as long as the uncertainty of the assigned values is taken into account during the results evaluation. In cases when the determination of homogeneity and stability is not feasible, the proficiency testing provider must demonstrate that the procedures used to get together, produce, pack and distribute the PT/EQA testing items are enough for the purpose of the proficiency testing.

The procedures to evaluate the homogeneity and stability must be documented and implemented, when corresponding, according to appropriate statistical designs. It must be demonstrated that the PT/EQA testing items are stable enough to assure that they will not suffer significant changes along the performance of the PT/EQA testing, including the storage and transport conditions [4].

Number of participants

The amount of participants, which integrate a comparison group, is a limiting factor of the scheme usefulness. When ISO 13528 [5] sets the equation to estimate the uncertainty associated to assigning a consensus value (Equation 1), it refers to $p > 10$, where p is the amount of participants in the comparison group.

It is interesting the information presented by the IUPAC guidelines [18]. It was designed to

establish guidelines for PT/EQA schemes with few participants. It establishes 30 as a minimum p (on the IUPAC guidelines $P=N$), considering that groups with $20 \leq p < 30$ must be evaluated in a critical manner to judge its usefulness.

At the PT/EQA program providers' in clinical environment we frequently find groups with less than 10 participants ($5 \leq p < 10$). It is very likely that an appropriate statistical analysis in these cases would indicate that the comparison group is not consistent.

Consistency of the pair comparison group

The assigned value "x" has a standard uncertainty u_x which depends on the method used for its estimation.

In general, at the clinical laboratory environment the assigned value (x) is estimated by the participants' consensus using robust statistics [5] according to the following equation:

$$u(x_{pt}) = 1,25 \times S^* / \sqrt{p}$$

Equation 1

The standard deviation for PT/EQA testing " σ_{pt} " is used to evaluate the size of the laboratory bias estimations found in a scheme round of a PT/EQA scheme. At the clinical laboratory environment, the standard deviation for the evaluation of the PT/EQA program, used in a round of one scheme, derives from the results reported by the participants of the same round based on the use of robust statistical techniques [5].

Therefore, in our case:

$$\sigma_{pt} = S^*$$

Equation 2

If the standard uncertainty for the assigned value " $u(x_{pt})$ " is too big as compared to the standard deviation for PT/EQA scheme round (σ_{pt}), then, there is a risk that some laboratories

would receive signals of action and warning due only to the inaccuracy of the assigned value determination, not to an issue of the measurement procedure performance at the laboratory itself. This is the reason why PT/EQA schemes providers must report the uncertainty associated to the true value assignment [19].

We must consider if the following relationship occurs (equation 3):

$$u(x_{pt}) < 0,3 \times \sigma_{pt}$$

Equation 3

If we replace equation 2 in equation 3 we obtain (equation 4):

$$u(x_{pt}) < 0,3 \times S^*$$

Equation 4

If this relationship occurs, the uncertainty associated to the estimation of the assigned value is negligible and the comparison group can be considered acceptable [5].

Frequency of submissions

At the clinical laboratory environment, the frequency of submissions varies and depends on the specific area of the laboratory and the scheme provider. For example, submissions at the clinical chemistry and hematology areas are usually monthly or fortnightly. At other areas like hemostasis or serology it is frequent that submissions are quarterly or bimonthly. The greater the amount of submissions per year, the greater usefulness it offers to the scheme.

RESULTS

Reports utility

PT/EQA testing reports must be clear and exhaustive and include information on the results of all the participants, together with

an indication of the individual participants' performance.

As we have already mentioned, the statistical treatment of data may be different among providers. However, we must remember that it is advisable that laboratories are able to participate in PT/EQA schemes accredited by ISO 17043 [4] or substantially complying with its guidelines. This standard establishes a series of requirements about the information that must be included on the reports.

Besides the information considered at the reports, their time of delivery is important. Reports must be available for participants within the established time [4].

THE SITUATION IN LATIN AMERICA

In the area, we will find laboratories of different sizes and varied complexity.

In general, in the Capital and/or big cities we will find a limited number of high complexity laboratories (considering the total amount of laboratories). These laboratories work under international standards (ISO, CAP, etc.) with a strong pressure on quality.

However the critical mass of laboratories in the area lives a very different situation. We frequently find very small laboratories and sometimes one-person laboratories. At these laboratories, due to different causes, there are flaws at quality level [20].

Regional regulations at quality level present inconveniences in many countries of the area and at the same time there are problems at the time of controlling its effective compliance.

If we consider the higher complexity laboratories we may see that they participate in PT/EQA programs voluntarily or complying with regulations according to the country considered. These laboratories participate in international and national schemes.

If we consider the many small laboratories of the area we will notice that voluntary participation in PT/EQA schemes is very low (remarkably low). When they participate they generally do in national or regional schemes.

At the same time, we have identified several flaws in interpreting results offered by the reports. We will deal with some of the critical aspects identified in the area concerning the participation in external quality assessment schemes.

Problems with the metrology traceability of the measurement procedures (calibration traceability)

There is a particularly critical situation in the area of clinical chemistry. Because of financial considerations, smaller laboratories tend to use reagents and calibrators of a commercial brand in instruments of a different commercial brand. Furthermore, not infrequently, they use calibrators of a third commercial brand. At this time of grouping in a PT/EQA scheme, inconveniences arise. Scheme providers need to open multiple comparison groups in order to cover all the possible combinations. As it is expectable, these groups count on very few participants, they are inconsistent groups and therefore the information provided by the reports has a limited value.

In other cases, the situation is so heterogeneous that scheme providers do not open individual groups and group these laboratories by method. Even though it is a single method, different commercial brands offer different traceability for the same method and comparison groups are again inconsistent.

These types of situations are a true inconvenience in the area.

Commutability

Considering the total amount of PT/EQA program providers in the area, only a few are accredited for the ISO 17043 Standard [4]. The

commutability of the samples is not always assured by the providers and therefore inconveniences related to matrix effects for specific measurement procedures may arise.

Consistency of the comparison group

Few local PT/EQA providers, considering the total amount of providers, report the uncertainty associated to the assigned value estimation, and besides, even if the information is available, laboratories do not frequently evaluate the consistency of the comparison group before making decisions. If we add that due to grouping issues (mixture of reagents and instruments) comparison groups with a very small number of participants ($p < 10$) are open or comparison groups with a very big p , but with an enormous S^* due to metrology traceability themes (calibration traceability) in the grouping by method or are massive (all the participants together in a single group), we come to the conclusion that it is crucially important to evaluate the consistency of the comparison groups before making decisions and this is not done in a routine way by laboratories.

Reactive behavior against proactive behavior

Laboratories' behavior faced to PT/EQA schemes is essentially reactive, namely, they react in front of exclusion. It means that laboratories specifically pay attention to rejected results, particularly to the ones from the last survey.

This as such generates non-conform products, i.e., patient results bear so huge an error that their clinical usefulness is invalidated.

Everyone working on analytical quality in the area intends that laboratories evaluate all the results, rejected and accepted, always reviewing the latest survey against previous ones. As such, through a correct interpretation of the laboratories reports, they could detect latent deviations and tendencies that still have not invalidated the

clinical usefulness of the routine results. If we achieve this change, laboratories will be able to anticipate potentially dangerous situations.

Acceptance and rejection criteria

In general, laboratories in the area trust the acceptance and rejection criteria established by the schemes providers. On numerous occasions, due to the reasons already stated, comparison groups are not consistent in several local schemes, with very big standard deviations that end up generating a big room for errors. The recommendation is that laboratories use the quality requirements that they must individually select for each measurement procedure to evaluate the measurement error of each individual survey. As such, to establish an acceptance criterion considering what is necessary for the measurement procedure considering its intended use.

Based on a set of surveys, using a valid statistical model [21], laboratory can estimate the bias of the measurement procedure (generally from 6 surveys). Once again the laboratory can evaluate the bias obtained in front of an established percentage (for example 50%) of the quality requirement to know if there is a clinically significant systematic error.

Underutilization of the information provided by the reports

Let's remember that the attitude of the laboratories towards the PT/EQA schemes is reactive, not proactive. If laboratories could evaluate the last survey against previous ones they could obtain valuable information to:

- Estimate biases on the measurement procedures [21].
- Integrate the information of these schemes with the information of the internal quality control to estimate the uncertainty of the

measurement procedures [21, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 36].

- Estimate quality requirements according to the state of the art (metrology considerations) [25, 26].
- Carry out a follow up of the Z score considering several rounds along the time to detect deviations and tendencies [2].

Rejected results

It is less frequent in the area, except for accredited or certified laboratories according to different schemes, to record rejected results. Besides, it is less frequent that laboratories evaluate the impact of these non-conformities on the already liberated results and less frequent still is that take steps to recall results of concern [2, 27].

CONCLUSIONS

At the level of PT/EQA, there is much to be done by the participating laboratories and the scheme providers.

It is fundamental to increase the level of participation and at the same time to work on training to achieve that laboratories can use these tools for on-going improvement. To achieve this we must generate simple and useful information; work on training in a planned way to eradicate incorrect practices.

It can be stated that laboratories participate in PT/EQA schemes voluntarily or due to pressure by regulating authorities. They spend money and time but do not recover the investment because they underuse the information.

Bachelor degree careers at university level do not update their academic programs and it is very little what is learnt at quality level and less still concerning analytical quality. It is frequent that a professional is formed without having seen anything of this matter during his/her university career.

The economic-financial situation of the region is complicated and in some countries, critical.

Many professionals of the clinical laboratory environment or blood bank are formed and trained to be able to transmit the acquired knowledge at their work places to improve the analytical quality. At the time of trying to implement these improvements they frequently crash with the laboratory heads due to resource issues.

This hostility sometimes is due to lack of information, lack of understanding of the matter by the laboratory heads; and at other times is caused by the lack of appropriate resources.

The health system of the region has not incorporated the concept of quality and this is also true for analytical quality as a requirement for reliable laboratory results. They are not willing to pay for quality.

This concept of not paying for quality is attributed to the lack of resources, although I do want to mention that many times it is due to lack of training and knowledge on the subject.

There is a lot of available information to improve different aspects of the management of PT/EQA schemes [39].

Local PT/EQA schemes providers are very different. There are compliant schemes offering understandable schemes, with ISO 17043 [4] accreditation and others that have a lot to improve, for example, at the level of commutability of their samples, the statistical management of data and timing and particularly laboratory grouping [34, 38].

REFERENCES

1. ISO 15189 (2012) Medical laboratories—Requirements for quality and competence. ISO, Geneva.
2. CLSI GP-27 A2 (2007) Using proficiency testing to improve the clinical laboratory. CLSI, Wayne, PA
3. Sciacovelli L, Secchiero S, Zardo L, Plebani M The role of the External Quality Assessment. *Biochimica Medica* 2010; 20(2):160-4.
4. ISO/IEC 17043 (2010) Conformity assessment—general requirements for proficiency testing. ISO, Geneva.
5. ISO 13528 (2015) Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. ISO, Geneva.
6. Siekmanna L. "Metrological traceability – a concept for standardization in laboratory medicine". *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(5): 953–957
7. Vesper HW, Thienpont LM. "Traceability in laboratory medicine". *Clin Chem* 2009; 55: 1067–1075.
8. Plebani M "Harmonization in laboratory medicine: the complete picture". *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(4): 741–751.
9. ISO 17511 (2003) In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. ISO, Geneva.
10. Miller GW, Jones GRD, Horowitz GL, and Weykamp C. "Proficiency Testing/External Quality Assessment: Current Challenges and Future Directions". *Clinical Chemistry* 57:12 (2011).
11. Miller GW, Myers GL, Rej R. "Why Commutability Matters". *Clinical Chemistry* 52, No. 4, 2006.
12. Armbruster D, Miller RR. "The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): A Global Approach to Promote the Standardisation of Clinical Laboratory Test Results. *Clin Biochem* 2007; 105- 114.
13. EURACHEM Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes. Second edition (2011). EEE-PT WG.
14. Analytical Methods Committee - Robust Statistic Part I & II. *Analyst* 1989; 114, 1693-1702.
15. Thompson, M. and Ellison, S.L.R., "Fitness for purpose – the integrating theme of the revised Harmonised Protocol for Proficiency Testing in Analytical Chemistry Laboratories". *Accred.Qual. Assur.* 2006;11, 373-378,
16. Tholen, D.W., "Statistical treatment of proficiency testing data". *Accred. Qual. Assur.*, 3 (1998),362-366.
17. Miller WG, Myers GL, Gantzer ML, Kahn SE, Schönbrunner ER, et al. "Roadmap for Harmonization of Clinical Laboratory Measurement Procedures". *Clinical Chemistry* 2011;57:8 1108-1117.
18. IUPAC/CITAC Guide: Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants—chemical analytical laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, Vol. 82, No. 5, pp. 1099–1135, 2010.
19. ISO/IEC Guide 43-1: 1997, Selection and use of proficiency testing scheme by laboratory accreditation bodies.

20. Westgard JO. "Basic QC Practices. Spanish". Translation by GA Migliarino Third Edition. Madison WI, 2010. IISBN 978-1-59425-098-9.
21. Nordtest Report TR 537, Version 3.1 (May 2012), Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Nordic Innovation.
22. Ellison SLR and Williams A (Eds). Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. Available from www.eurachem.org.
23. EUROLAB Technical Report 1/2006. "Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results". Paris, France.
24. EUROLAB Technical Report 1/2002 –"Measurement Uncertainty in testing". Paris, France.
25. Hyltoft Petersen P, Fraser CG. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine: 10 years on from the Stockholm consensus conference. *Accred Qual Assur* 2010; 15:323–330.
26. Klee GG. Establishment of outcome-related analytical performance goals. *Clin Chem* 2010;56:714–722.
27. CLSI. "Nonconforming Event Management"-Second Edition. CLSI QMS11-A2. Wayne; PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
28. EUROLAB Technical Report 1/2007. "Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation". Paris, France
29. White GH. Basics of estimating measurement uncertainty. *Clin Biochem Rev* August 2008; 29(Suppl. (i)):S53.
30. BIPM, IEC, IFCC, et al. Evaluation of measurement data—guide to the expression of uncertainty in measurement GUM. JCGM 1002nd Ed. 2008 [<http://www.bipm.org/>].
31. Koch M and Baumeister F. "On the use of consensus means as assigned values". *Accred Qual Assur* 2012;17:395–398.
32. Heydorn K. "The quality of consensus values". *Accred Qual Assur* 2013; 18:243–245.
33. Ya L. Xiao, Chuan B. Zhang, Hai J. Zhao, Feng F. Kang, Wei Wang, Kun Zhong, Shuai Yuan, Zhi G. Wang. "Application of ISO 13528 robust statistical method for external quality assessment of blood glucose measurements in China". *Accred Qual Assur* 2014; 19:397–401.
34. Gun-Munro J. "The challenges and benefits of implementing the requirements of ISO/IEC 17043 by PT/EQA providers". *Accred Qual Assur* 2012; 17:363–370.
35. Srnková J and Zbiral J. "Comparison of different approaches to the statistical evaluation of proficiency tests". *Accred Qual Assur* 2009; 14:467–471.
36. Patriarca M, Chiodo F, Castelli M, Menditto A. "Estimates of uncertainty of measurement from proficiency testing data: a case study". *Accred Qual Assur* 2006; 11: 474–480.
37. Unsal I, Coskun A, Serteser M, Inal TC, Ozpinar A. "Toward standardization of quality assessment in laboratory medicine by using the same matrix samples for both internal and external quality assessments". *Accred Qual Assur* 2010;15:621–627.
38. Lehmann C. "Accrediting PT/EQA providers to ISO/IEC 17043". *Accred Qual Assur* 2012; 17:371–374.
39. de Albano FM, ten Caten CS. "Proficiency tests for laboratories: a systematic review". *Accred Qual Assur* 2014; 19:245–257.
40. Kang F, Wang W, Zhang CB, Wang ZG. "Establishment of an assigned value and its uncertainty for tumour markers in proficiency testing in China". *Accred Qual Assur* 2013; 18:435–439.
41. Kim SY, Chun S, Lee W and Min WK. "Commutability of proficiency testing (PT): status of the matrix-related bias in general clinical Chemistry". *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(8): e169–e173.

Esquemas de evaluación externa de la calidad en América Latina

Gabriel Alejandro Migliarino

Gmigliarino Consultores, Buenos Aires, Argentina

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

Gabriel Alejandro Migliarino, Bioquímico
Director de Gmigliarino Consultores
Carlos Tejedor 1323 1 A
1706 Haedo
Buenos Aires, Argentina
Teléfono: +54 11 4460 2527
Correo electrónico:
gmigliarino@gmigliarino.com

Palabras clave:

PT, EQA, valor asignado, desviación estándar, incertidumbre estándar del valor asignado, grupo de comparación, desempeño, uso previsto

RESÚMEN

Como profesionales del laboratorio clínico debemos generar resultados productos y servicios clínicamente útiles para el cuidado de la salud de los pacientes. Los laboratorios deben participar en uno o más programas de comparación interlaboratorio, como un programa de ensayo de aptitud (PT por sus siglas en inglés) o un programa de evaluación externa (EQA, por sus siglas en inglés) como parte del proceso de aseguramiento de la calidad de los resultados. No obstante no es suficiente con participar, existen factores críticos que deben ser considerados al momento de seleccionar un proveedor de un PT/EQA. Ya que en la mayoría de los casos los proveedores de esquemas del área de laboratorios clínicos ofrecen valores asignados obtenidos a partir del consenso de los participantes para nuestra comparación, es fundamental evaluar la consistencia del grupo de comparación antes de tomar decisiones.

En la medida de lo posible debemos participar en esquemas acreditados bajo la norma ISO 17043 [4] o que cumplan sustancialmente con sus lineamientos, esto nos asegura un tratamiento estadístico correcto de los datos mediante técnicas de estadística robusta como las propuestas en la ISO 13528 [5] y a su vez

nos brinda la información necesaria para evaluar la consistencia del grupo de comparación.

En América Latina la tasa de participación y esquemas de evaluación externa de la calidad no es muy alta. Los proveedores de esquemas locales se enfrentan a inconvenientes al momento de armar los grupos de comparación por la presencia de mezcla de reactivos e instrumentos de distintas casas comerciales. Esto provoca que muchas veces los grupos de comparación no sean consistentes por tener pocos participantes. Además en el área por lo general la conducta de los laboratorios es reactiva y no proactiva. Existe una tendencia a prestar atención solo a los resultados rechazados y no los aceptados. A su vez no es frecuente que los laboratorios del área evalúen la última encuesta frente a las encuestas anteriores.

Todo esto implica que la información que nos brinda la participación en este tipo de esquemas está siendo subutilizada y hay mucho trabajo por hacer.

INTRODUCCIÓN

El principal objetivo del laboratorio clínico es generar resultados productos y servicios clínicamente útiles para el cuidado de la salud de los pacientes. Como parte del proceso de aseguramiento de la calidad de los resultados de análisis, los laboratorios deben participar en uno o más programas de comparación interlaboratorio, tal como un programa de evaluación externa de la calidad (EQA, por sus siglas en inglés) o un programa de ensayo de aptitud (PT, por sus siglas en inglés) apropiado para el análisis y la interpretación de sus resultados [1].

Este tipo de esquemas evalúa el desempeño analítico del laboratorio con respecto a sus pares (otros laboratorios usando el mismo método e instrumento), estándares de referencia y /o laboratorios de referencia [2].

Estos esquemas están diseñados para monitorear el desempeño del laboratorio de forma retrospectiva utilizando muestras “ciegas” analizadas como si fueran muestras de pacientes. Los resultados son enviados al organizador del esquema sobre una base regular para el análisis estadístico; cada laboratorio recibirá entonces un informe que compara su desempeño con el de otros participantes del mismo programa. Estos esquemas aportan una validación externa de los resultados del laboratorio y también constituyen una herramienta valiosa para el monitoreo interno del desempeño del laboratorio. Esto genera un beneficio para el laboratorio, sus clientes e incluso para los organismos de acreditación y/o regulación.

El uso de este tipo de esquemas como una herramienta de monitoreo interno no se limita a la investigación de resultados inaceptables. El monitoreo de todos los resultados (aceptados y rechazados), evaluando siempre la última encuesta frente a encuestas anteriores, permite al laboratorio la identificación de desvíos y tendencias que en función del tiempo pueden generar un rechazo, poniendo de esta forma en evidencia problemas potenciales, no reconocidos, vinculados a la presencia de un error aleatorio significativo, un error sistemático significativo o incluso error humano.

La evaluación del reporte completo (resumen) permite el desempeño de un procedimiento de medida frente al de otros procedimientos de medida. Los informes bien elaborados permiten identificar diferencias entre distintos procedimientos de medida para un mismo mensurando producto de un error sistemático significativo o problemas vinculados a una pobre reproducibilidad.

Los esquemas tradicionales (EQA / PT) tienden a abordar sólo el proceso analítico (procedimientos de examen), pero algunos esquemas innovadores han sido introducidos recientemente

para evaluar tanto las actividades pre como post-analíticas del laboratorio clínico [3].

También es importante tener en cuenta que cada esquema (EQA / PT) presenta algunas limitaciones y que no es apropiado utilizar estos esquemas (EQA / PT) como el único medio para la evaluación de la calidad de los laboratorios. Por lo tanto, existe la necesidad de subrayar que el control estadístico interno de la calidad (IQC, por sus siglas en inglés), EQA / PT y otras herramientas tienen que ser aplicadas y utilizadas para supervisar y mejorar la calidad en el diagnóstico del laboratorio clínico.

¿CUÁL ES LA DIFERENCIA ENTRE EQA Y PT?

Actualmente, las definiciones de programa de evaluación externa de la calidad (EQA) y de programas de ensayo de actitud (PT) se utilizan indistintamente como herramientas valiosas en el proceso de mejora de la calidad de los servicios de laboratorio clínico [2]. Sin embargo, los principales objetivos de EQA son educativos, y pueden ser apoyados por elementos adicionales, tales como los planes específicos destinados a extender la evaluación a través de todas las fases del ciclo de prueba, incluyendo la interpretación de los resultados.

La norma ISO / IEC 17043 [4] se refiere en su desarrollo a los programas de ensayo de aptitud pero menciona las particularidades de los programas de evaluación externa de la calidad que se aplican en el área clínica: *“Algunos proveedores de ensayos de aptitud (PT) en el área médica usan el término programas de evaluación externa de la calidad (EQA) para sus programas de ensayos de aptitud, para sus programas más extensos, o para ambos”*.

A su vez en el ANEXO A (A.4) de la misma norma dice: *“Los programas EQA (tales como los proporcionados para las pruebas de laboratorios clínicos) ofrecen una variedad de programas de comparaciones interlaboratorios basados*

en este modelo tradicional de ensayos de aptitud pero con una aplicación más amplia de los programas. Muchos programas EQA se diseñan para valorar el volumen de trabajo del laboratorio y no sólo de los procesos de ensayo. La mayor parte de los programas EQA son programas continuos que incluyen un seguimiento a largo plazo del desempeño de un laboratorio. Una característica típica de los programas EQA es que instruyen a los participantes y promueven la mejora de la calidad. Los comentarios de carácter consultivo y educativo constituyen parte del informe que se entrega a los participantes para lograr este fin”.

De acuerdo con una definición ampliamente aceptada, los PT son programas de evaluación del desempeño de los participantes con respecto a criterios previamente establecidos mediante comparaciones interlaboratorios [4]. Un PT es un programa en el que múltiples muestras se envían periódicamente a los miembros de un grupo de laboratorios participantes para su análisis y / o identificación. Cada uno de los resultados informados por el laboratorio se comparara con los de otros laboratorios pertenecientes al mismo grupo o con un valor asignado por un procedimiento válido.

TRATAMIENTO ESTADÍSTICO DE LOS DATOS

Los resultados de los programas de PT/EQA pueden ser de muchas formas, abarcando una amplia gama de datos y obedeciendo a distintas distribuciones estadísticas. Es importante que el diseño utilizado por el proveedor del PT/EQA sea apropiado para el tipo y el propósito del esquema de PT/EQA que está organizando. Además el diseño utilizado por el proveedor de PT debe describirse plenamente a los participantes. Las técnicas estadísticas preferidas son las que han sido descritas en la norma ISO 13528 [5], aunque otros enfoques válidos pueden ser utilizados [13].

Los principales enfoques estadísticos utilizados en programas de PT/EQA se basan en la distribución normal de los datos. Sin embargo, es común que, aunque el conjunto de resultados de los participantes obedezcan esencialmente a una distribución normal, estén contaminados en ambos extremos de la distribución con una pequeña proporción de valores extremos. El enfoque original utilizado por los proveedores de PT/EQA (y todavía se utiliza en algunos programas de PT/EQA) era utilizar pruebas estadísticas para identificar la presencia de valores extremos en el conjunto de datos original. Sin embargo, el enfoque más común actualmente utilizado por los proveedores de PT/EQA, recomendado en la norma ISO 13528 [5], es el uso de estadística robusta [14, 15]. Los estadísticos robustos tiene la ventaja de reducir la contribución de los valores extremos a los parámetros estadísticos calculados como la media y la desviación estándar. Existen una serie de modelos que aplican estadística robusta, algunos de los cuales se describen en la norma ISO 13528 [5].

Uno de los elementos básicos de todo programa de PT/EQA es la evaluación del desempeño de cada participante. Para ello, el proveedor del programa de PT/EQA tiene que establecer básicamente dos valores, que se utilizan para la evaluación del desempeño:

- Valor Asignado
- Desviación estándar del grupo de comparación en el esquema

Además se espera que el proveedor del programa de PT/EQA proporcione una estimación de la incertidumbre de medición asociada al valor asignado y una declaración de la trazabilidad metrológica del mismo cuando sea posible. Este concepto ha sido incluido en la norma ISO / IEC 17043 [4]. La pertinencia, necesidad y viabilidad de esta estimación serán determinadas por el diseño del esquema del PT/EQA.

Diferentes métodos pueden ser utilizados para establecer estos valores [5, 16, 35]. No existe a la fecha una estandarización o acuerdo sobre el protocolo a ser aplicado. El diseño estadístico debe ser documentado por el proveedor del programa de PT/EQA y debe ser tenido en cuenta a la hora de seleccionar un esquema de PT/EQA. El conocimiento de la incertidumbre de medición asociada a la estimación del valor asignado será relevante al momento de evaluar que tan confiable es el grupo de comparación que nos ofrece ese programa de PT/EQA.

Valor asignado

Hay, como se describe en la norma ISO 13528 [5], esencialmente cinco métodos disponibles para obtener el asignado valor y su incertidumbre típica asociada:

1. Formulación
2. Materiales certificados de referencia
3. Valores de referencia
4. Valores consenso aportados por un grupo de laboratorios expertos
5. Valor consenso obtenido a partir de los participantes

El uso de un valor de consenso, producido en cada ronda del programa de PT/EQA, en base a los resultados obtenidos por los participantes está ampliamente difundido en el área del laboratorio clínico (opción 5). El valor de consenso suele ser estimado utilizando técnicas de estadística robusta. El enfoque de consenso es claramente el más sencillo y, en algunos casos, por ejemplo, al usar muestras de matriz naturales, es a menudo la única forma de establecer una estimación del valor real [31, 32].

Como es de esperar este modelo tiene sus limitaciones:

- A. Puede que no haya un consenso real entre los participantes;

- B. El consenso puede estar sesgado por el uso general de una metodología defectuosa y este sesgo no será reflejado en la incertidumbre estándar del valor asignado.

Desviación estándar del grupo de comparación en el esquema

Hay, como se describe en la norma ISO 13528 [5], esencialmente cinco enfoques para determinar la desviación estándar del grupo de comparación en el PT/EQA que será empleada para establecer el rango aceptable de resultados de participantes:

1. Valor prescrito.
2. Percepción.
3. A partir de un modelo general.
4. A partir de los resultados de un experimento de precisión.
5. A partir de los datos obtenidos en la ronda de un esquema de PT/EQA

Como era de esperar, en el entorno del laboratorio clínico la mayoría de los proveedores de los esquemas de PT/EQA recurren a la última opción (opción 5).

Con este enfoque, la desviación estándar para evaluación del programa de PT/EQA usada en una ronda de un esquema, deriva de los resultados reportados por los participantes en la misma ronda. Será la desviación estándar robusta de los resultados reportados por todos los participantes.

Una desventaja de este enfoque es que el valor puede variar sustancialmente de ronda a ronda. Esta variación dificulta el seguimiento por parte del laboratorio del índice de desvío estándar "IDE" (Z Score, en inglés) en función del tiempo en búsqueda de desvíos y tendencias [13].

Incertidumbre de medición asociada a la estimación del valor asignado

Como hemos mencionado en el entorno de los proveedores de programas PT/EQA para laboratorios clínicos se recurre al consenso de los participantes para obtener el valor asignado y la desviación estándar del grupo de comparación. En el mejor de los casos los proveedores recurren a técnicas de estadística robusta para sus estimaciones siguiendo los lineamientos de la ISO 13528 [5]. En otros casos los proveedores de los programas de PT/EQA recurren a modelo estadísticos más simples que no están basados en técnicas de estadística robusta [33].

Trabajaremos sobre un valor asignado y desviación estándar establecidos a partir del consenso de los participantes empleando técnicas de estadística robusta [40] como la descrita en la ISO 13528 [5].

La incertidumbre asociada a la estimación del valor asignado se calcula como (ecuación 1):

$$u(x_{pt}) = 1,25 \times S^* / \sqrt{p}$$

Ecuación 1

Siendo:

$u(x_{pt})$: Incertidumbre asociada a la estimación del valor asignado en la ronda

S^* : Desviación estándar robusta del grupo de participantes de la ronda

p : Cantidad de participantes del grupo de comparación de la ronda

ASPECTOS CRÍTICOS AL MOMENTO DE SELECCIONAR UN PROGRAMA DE EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD (EQA) O PROGRAMA DE ENSAYO DE APTITUD (PT)

Vamos a evaluar los aspectos críticos a considerar al momento de seleccionar un esquema de evaluación externa de la calidad. No todos los

esquemas de evaluación externa de la calidad ofrecen lo mismo. La norma ISO 15189 [1] dice: “Se recomienda que el laboratorio participe en programas de evaluación externa de la calidad que cumplan sustancialmente con los requisitos pertinentes de la norma ISO/IEC 17043 [4].” Es importante mencionar que el tratamiento estadístico de los datos propuestos por esta norma cumple con lo establecido en la norma ISO 13528 [5].

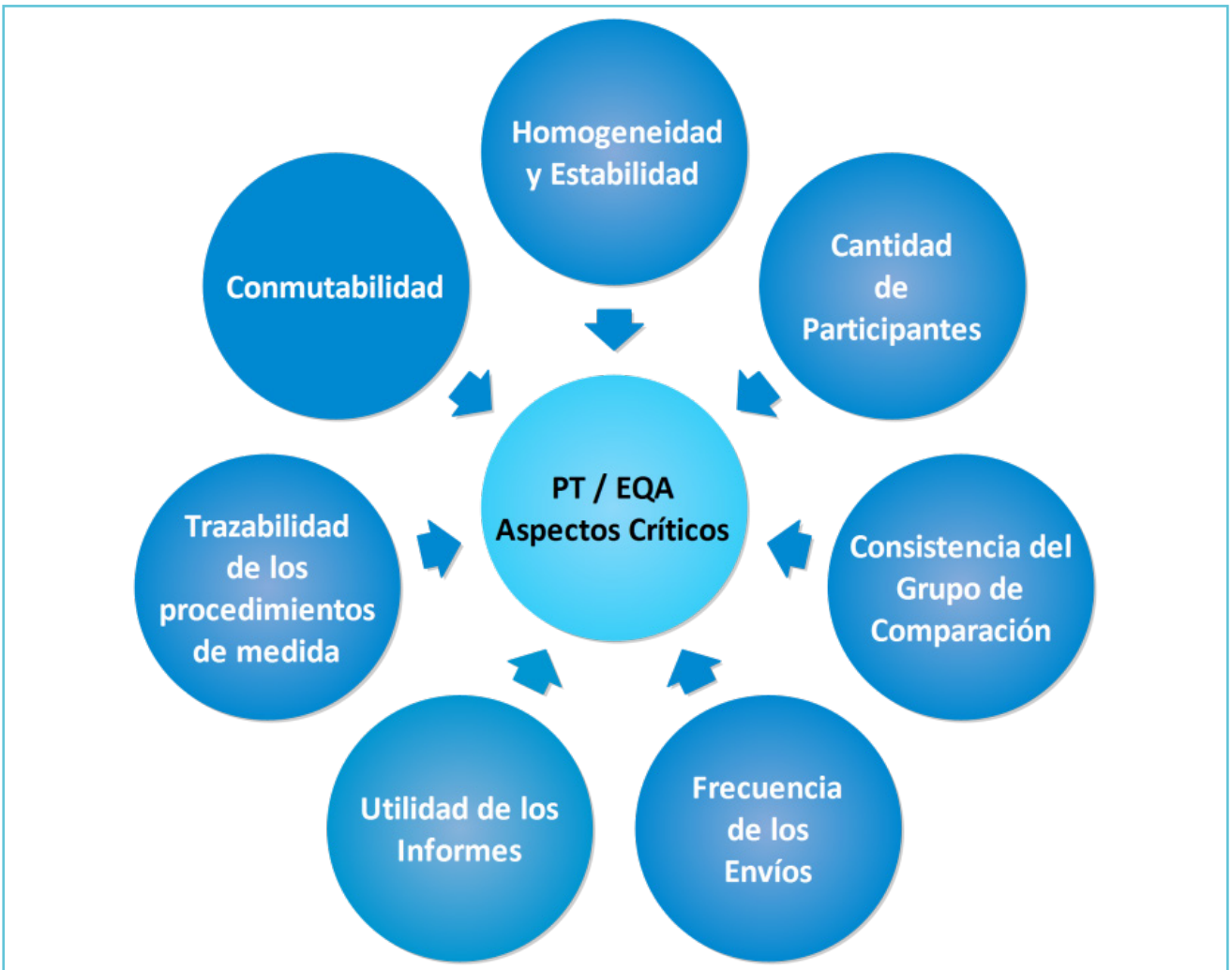
Los aspectos críticos que vamos a considerar (Figura 1) están tratados en estas dos normas [4,5].

Recordemos que una encuesta EQA / PT se lleva a cabo mediante el envío de una muestra o un conjunto de muestras por parte de una entidad organizadora a un laboratorio participante. El laboratorio debe procesar las muestras de la misma forma que lo hará con las muestras de rutina, es decir, en la medida de lo posible, como si fuera una muestra de un paciente.

Trazabilidad de los procedimientos de medida

Es un objetivo primordial lograr que los resultados obtenidos sobre una misma muestra a tiempos comparables en diferentes laboratorios utilizando distintos procedimientos de medida

Figura 1 Puntos clave PEA/AEC



sean equivalentes, dentro límites clínicamente significativos, para permitir un uso óptimo de guías de práctica clínica para el diagnóstico de enfermedades y un cuidado óptimo de la salud del paciente. Cuando los resultados son obtenidos a partir de procedimientos de medida que no están estandarizados o armonizados, en distintos laboratorios, es de esperar que su valor numérico sea diferente e inclusive es de esperar que la interpretación clínica del mismo sea distinta.

Actualmente la estandarización y la armonización de los procedimientos de medida (trazabilidad de la calibración) se basa en los principios de trazabilidad que se describen en la ISO 17511 [9], que incluye 5 categorías de sistemas de referencia. Cuando hablamos de las categorías 1, 2, y 3 hablamos de procedimientos de medida estandarizados, y cuando hablamos de la categoría 4 hablamos de procedimientos de medida armonizados. En la categoría 5 se agrupan los procedimientos de medida para los cuales el fabricante es el único responsable sobre la cadena de trazabilidad de la calibración [6, 7, 8,17].

Es fundamental que los laboratorios clínicos conozcan la trazabilidad metrológica de sus procedimientos de medida para agruparse correctamente en los programas de PT/EQA. Recordemos que la mayoría de los proveedores de esquemas de PT/EQA estiman el valor asignado por el consenso de los resultados de los participantes del grupo de comparación. Si nos agrupamos incorrectamente es probable que el valor asignado, frente al cual seremos evaluados, no corresponda a la mejor estimación del valor verdadero de nuestro procedimiento de medida considerando su trazabilidad metrológica (Trazabilidad de la calibración).

Conmutabilidad

El objetivo de los programas de PT/EQA es verificar de manera recurrente que los resultados de los laboratorios cumplen con los requisitos de la calidad establecidos de acuerdo al uso previsto de los procedimientos de medida para el correcto cuidado de la salud de los pacientes.

Un factor clave para la correcta interpretación de los resultados de los programas de PT/EQA es el conocimiento de la conmutabilidad de las muestras y el procedimiento empleado para la asignación del valor verdadero de las mismas. Una muestra de PT/EQA conmutable demuestra la misma relación numérica entre diferentes procedimientos de medida que la que es esperada para muestras de pacientes. Las muestras no conmutables de PT/EQA presentan un sesgo producto de efectos de matriz de magnitud desconocida que limita la interpretación clínica de los resultados [10, 11, 37, 41].

Con respecto a la conmutabilidad de las muestras de PT/EQA la ISO 17043 [4] dice: *“Es conveniente que los ítems de ensayo de aptitud coincidan, en términos de matriz, mensurandos y concentraciones, tanto como sea viable, con el tipo de ítems o materiales de los ensayos de rutina o calibración.”*

Homogeneidad y estabilidad

Se deben establecer los criterios de homogeneidad y estabilidad apropiados que deben basarse en el efecto que tendría la ausencia de estas características sobre los resultados y la evaluación del desempeño de los participantes.

En algunos casos no es factible someter los ítems de ensayo PT/EQA a ensayos de homogeneidad y estabilidad. Un ejemplo de dichos casos sería, cuando se dispone de material limitado para preparar los ítems de ensayo PT/EQA. En algunos casos, la mejor opción disponible es la de materiales que no son suficientemente homogéneos ni estables; en estos casos pueden

ser aún útiles como ítems de ensayo de PT/EQA, siempre que las incertidumbres de los valores asignados o la evaluación de los resultados tomen en cuenta este hecho. En los casos en que la determinación de la homogeneidad y estabilidad no sea factible, el proveedor de ensayos de aptitud debe demostrar que los procedimientos utilizados para reunir, producir, embalar y distribuir los ítems de ensayo de PT/EQA son suficientes para el propósito de los ensayos de aptitud.

Se deben documentar e implementar los procedimientos para la evaluación de la homogeneidad y estabilidad, cuando corresponda, de acuerdo con diseños estadísticos apropiados. Se debe demostrar que los ítems de ensayo de PT/EQA son suficientemente estables para asegurarse de que no sufrirán cambios significativos a lo largo de la realización del ensayo de PT/EQA, incluyendo las condiciones de almacenamiento y transporte [4].

Cantidad de participantes

La cantidad de participantes que forman parte de un grupo de comparación es un factor limitante de la utilidad del esquema. La ISO 13528 [5] al momento de establecer la ecuación para estimar la incertidumbre asociada a la asignación de un valor por consenso (ecuación 1) hace referencia a $p > 10$, siendo p la cantidad de participantes del grupo de comparación.

Es interesante la información presentada en la guía de IUPAC [18]. En esta guía diseñada para establecer lineamientos para esquemas de PT/EQA con pocos participantes se establece como un p mínimo (en la guía de IUPAC $P=N$) de 30, considerando que los grupos con $20 \leq p < 30$ deben ser evaluados de manera crítica para juzgar sobre su utilidad.

En el entorno de los proveedores de esquemas de PT/EQA es frecuente encontrar grupos con menos de 10 participantes ($5 \leq p < 10$). Es muy

probable que un análisis estadístico apropiado nos indique que el grupo de comparación no es consistente en estos casos.

Consistencia del grupo par de comparación

El valor asignado “ x ” tiene una incertidumbre estándar $u(x_{pt})$ que depende del método que se utiliza para su estimación.

En el ámbito del laboratorio clínico por lo general el valor asignado (x) se estima por el consenso de los participantes empleando estadística robusta [5] según la siguiente ecuación:

$$u(x_{pt}) = 1,25 \times S^* / \sqrt{p}$$

Ecuación 1

La desviación estándar para ensayos de PT/EQA “ σ ” se utiliza para evaluar el tamaño de las estimaciones del sesgo del laboratorio encontrado en una ronda de un esquema de PT/EQA. En el entorno del laboratorio clínico la desviación estándar para la evaluación del programa de PT/EQA, usada en una ronda de un esquema, deriva de los resultados reportados por los participantes en la misma ronda a partir del empleo de técnicas de estadística robusta [5].

Por lo tanto en nuestro caso:

$$\sigma = S^*$$

Ecuación 2

Si la incertidumbre estándar del valor asignado (u_x) es demasiado grande en comparación con la desviación estándar para la ronda del esquema de PT/EQA (σ), entonces hay un riesgo de que algunos laboratorios reciban señales de acción y de advertencia debido solo a la inexactitud en la determinación del valor asignado, no debido a un inconveniente en el desempeño del procedimiento de medida en el propio laboratorio. Es por esta razón que los proveedores de esquemas de PT/EQA deben informar la incertidumbre asociada a la asignación del valor verdadero [19].

Si se cumple la siguiente relación (ecuación 3):

$$u(x_{pt}) \leq 0,3 \times \sigma$$

Ecuación 3

Si reemplazamos la ecuación 2 en la ecuación 3 obtenemos (ecuación 4):

$$u(x_{pt}) \leq 0,3 \times S^*$$

Ecuación 4

Si se cumple esta relación la incertidumbre asociada a la estimación del valor asignado es despreciable y el grupo de comparación puede ser considerado aceptable [5].

Frecuencia de los envíos

En el entorno de los laboratorios clínicos la frecuencia de los desafíos es variable y dependerá del área específica del laboratorio y del proveedor del esquema. Así por ejemplos los desafíos en el área de química clínica y hematología suelen ser mensuales o quincenales. En otras áreas como ser hemostasia o serología es frecuente que los envíos sean trimestrales o bimestrales. A mayor cantidad de desafíos por año, mayor utilidad aporta el esquema.

Utilidad de los informes

Los informes de ensayos de PT/EQA deben ser claros y exhaustivos e incluir información sobre los resultados de todos los participantes, junto con una indicación del desempeño de los participantes individuales.

Como ya hemos mencionado el tratamiento estadístico de los datos puede ser diferente entre proveedores. No obstante recordemos que es recomendable que los laboratorios accedan a participar en esquemas de PT/EQA acreditados por la ISO 17043 [4] o que cumplan de manera sustancial con sus lineamientos. Esta norma establece una serie de requisitos sobre

la información que debe ser incluida en los informes.

Además de la información contemplada en los informes, es importante el plazo de entrega de los mismos. Los informes se deben poner a disposición de los participantes dentro de los plazos establecidos [4].

PT/EQA: ¿CUÁL ES LA SITUACIÓN EN AMÉRICA LATINA?

Vamos a encontrar en la región laboratorios de distinto tamaño y variada complejidad.

Por lo general, en las capitales y/o grandes ciudades ubicaremos un número acotado de laboratorios de alta complejidad (considerando la cantidad total de laboratorios). Estos laboratorios trabajan bajo estándares internacionales (ISO, CAP, etc.) con una fuerte presión sobre lo que es calidad.

No obstante la masa crítica de laboratorios de la región vive una situación muy diferente. Es frecuente encontrar laboratorios muy pequeños y hasta en algunos casos unipersonales. En estos laboratorios por distintos motivos existen falencias a nivel de lo que es calidad [20].

Las regulaciones regionales a nivel de calidad presentan inconvenientes en muchos países de la región y a su vez existen problemas al momento de controlar su cumplimiento efectivo.

Si consideramos los laboratorios de mayor complejidad podremos ver que participan en programas de PT/EQA de manera voluntaria o en cumplimiento de regulaciones de acuerdo al país en cuestión. Estos laboratorios acceden a esquemas internacionales y nacionales.

Si consideramos a los laboratorios pequeños que están presentes en la región en un gran número notaremos que la participación voluntaria en esquemas de PT/EQA es muy baja (notablemente baja). Cuando participan lo hacen por lo general en esquemas nacionales o regionales.

A su vez hemos identificado muchas falencias al momento de aprovechar los resultados que ofrecen los informes. Vamos a tratar algunos de los aspectos críticos identificados en el área con respecto a la participación en esquemas de evaluación externa de la calidad.

Problemas con la trazabilidad metrológica de los procedimientos de medida (trazabilidad de la calibración)

Existe una situación particularmente crítica en el área de química clínica. Por una cuestión de costos, los laboratorios de menor envergadura suelen utilizar reactivos y calibradores de una casa comercial en instrumentos de otra casa comercial distinta. Incluso a veces, no siempre, emplean calibradores de una tercera casa comercial. Al momento de agruparse en un esquema de PT/EQA surgen los inconvenientes. Los proveedores de los esquemas se ven en la necesidad de abrir múltiples grupos de comparación para contemplar todas las combinaciones posibles. Como es de esperar, estos grupos cuentan con muy pocos participantes, son grupos inconsistentes y por lo tanto la información que surge de la evaluación de los informes tiene un valor limitado.

En otros casos la situación es tan heterogénea que los proveedores de los esquemas no abren grupos individuales y agrupan a estos laboratorios por método. Si bien el método es único, distintas casas comerciales ofrecen diferentes trazabilidad para el mismo método y los grupos de comparación una vez más son inconsistentes.

Este tipo de situaciones son un verdadero inconveniente en el área.

Conmutabilidad

Considerando la cantidad total de proveedores de esquemas de PT/EQA del área son muy pocos los que están acreditados por la norma ISO 17043 [4]. La conmutabilidad de las muestras

no siempre se encuentra asegurada por los proveedores y por lo tanto suelen surgir inconvenientes vinculados a afectos de matriz para procedimientos de medida específicos.

Consistencia del grupo de comparación

Son pocos los proveedores locales de PT/EQA, considerando la cantidad total de proveedores, los que informan la incertidumbre asociada a la estimación del valor asignado, y además por más que la información esté disponible, los laboratorios no suelen evaluar la consistencia del grupo de comparación antes de tomar decisiones. Si a esto le sumamos que por problemas de agrupación (mezclas de reactivos e instrumentos) se abren grupos de comparación con un p muy pequeño $p < 10$ o grupos de comparación con un p muy grande pero con un S^* enorme por temas de trazabilidad metrológica (trazabilidad de la calibración) en las agrupaciones por método o masivas (todos los participantes juntos en un único grupo) caeremos en la conclusión de que resulta, de fundamental importancia, evaluar la consistencia de los grupos de comparación antes de tomar decisiones y esto no se hace de manera rutinaria.

Conducta reactiva versus conducta proactiva

La conducta de los laboratorios frente a los esquemas de PT/EQA es fundamentalmente reactiva, es decir reaccionan frente a una exclusión. Esto significa que los laboratorios le prestan atención específicamente a los resultados rechazados, particularmente a los de la última encuesta.

Trabajando de esta forma permitimos que se generen productos no conformes, es decir resultados de pacientes con un error tan grande que invalida su utilidad clínica.

Los que trabajamos en calidad analítica en el área tratamos que los laboratorios evalúen todos los resultados, rechazados y aceptados,

revisando siempre la última encuesta frente a encuestas anteriores. De esta manera mediante una interpretación correcta de los informes los laboratorios podrán detectar desvíos y tendencia que están latentes pero que aún no han invalidado la utilidad clínica de los resultados de rutina. Si logramos este cambio los laboratorios podrán anticipar situaciones potencialmente peligrosas.

Criterios de aceptación y rechazo

Por lo general los laboratorios del área confían en los criterios de aceptación y rechazo provistos por los proveedores de los esquemas. Recordemos que muchas veces, por los motivos ya explicados, los grupos de comparación suelen ser poco consistentes en varios esquemas locales, con desviaciones estándar muy grandes que terminan generando un espacio enorme para el error. Lo que se sugiere es que los laboratorios utilicen los requisitos de la calidad que deben seleccionar para cada procedimiento de medida para evaluar el error de medida de cada encuesta individual. Es decir establecer un criterio de aceptación considerando lo que se necesita del procedimiento de medida considerando su uso previsto.

Además, a partir de un conjunto de encuestas, empleando un modelo estadístico válido [21] los laboratorios pueden estimar el sesgo del procedimiento de medida (por lo general a partir de 6 encuestas). Una vez más el laboratorio puede evaluar el sesgo obtenido frente a un porcentaje establecido (por ejemplo 50%) del requisito de la calidad para saber si existe un error sistemático clínicamente significativo.

Subutilización de la información provista en los informes

Recordemos que la postura de los laboratorios frente a los esquemas de PT/EQA es reactiva, no proactiva. Si los laboratorios logran evaluar la

última encuesta frente a encuestas anteriores podrían obtener una información valiosa para:

- Estimar el sesgo de los procedimientos de medida [21].
- Integrar la información de estos esquemas con la información del control estadístico interno de la calidad para estimar la incertidumbre de los procedimientos de medida [21, 22, 23, 24, 28,29, 30, 36].
- Estimar requisitos de la calidad de acuerdo a estado del arte (consideraciones metrológicas) [25,26].
- Efectuar un seguimiento del IDE en función del tiempo para detectar desvíos y tendencias [2].

Resultados rechazados

Es poco frecuente en el área, salvo en los laboratorios acreditados o certificados según distintos esquemas, el registro de los resultados no conformes. Además es poco frecuente que los laboratorios evalúen el impacto de estas no conformidades sobre los resultados ya liberados y menos frecuente aun es que tomen alguna acción al respecto [2, 27].

CONCLUSIONES

A nivel de PT/EQA existe mucho por hacer por parte de los laboratorios y por parte de los proveedores de los esquemas.

Es fundamental aumentar el nivel de participación y a su vez trabajar en capacitación para lograr que los laboratorios puedan emplear estas herramienta en la mejora continua. Para lograr esto debemos genera información simple y útil, trabajar en la capacitación de manera planificada para erradicar las prácticas incorrectas.

Lo que verdaderamente es una pena, es que los laboratorios participan de esquemas de PT/EQA, a veces de manera voluntaria, a veces por

la presión ejercida por una regulación. Gastan tiempo y dinero pero no recuperan su inversión por subutilizar la información.

A nivel de educación la preocupación es grande. Las carreras de grado a nivel universitario no actualizan sus programas académicos y es muy poco lo que se ve a nivel de calidad y menos aún a nivel de calidad analítica. No es extraño que un profesional se forme sin haber visto este tema durante su carrera universitaria. No es nada nuevo el que la situación económica financiera de la región es complicada y en algunos países crítica.

Muchos profesionales del ámbito del laboratorio clínico o banco de sangre se forman y capacitan para poder volcar los conocimientos adquiridos en sus puestos de trabajos en la mejora de la calidad analítica. Al momento de querer implementar estas mejoras muchas veces chocan con la dirección del laboratorio por un tema de recursos.

Esta negativa a veces obedece a lo que es desconocimiento, producto de una falta de comprensión del tema por parte de la dirección; y otras veces la negativa obedece a que es imposible disponer de recursos que no existen. Aunado a esto el sistema de salud en la región no tiene incorporado el concepto de calidad y mucho menos aun el de calidad analítica como un requisito para los resultados, hecho por el cual no están dispuestos a pagar por lo que es calidad. Este concepto de no pago de la calidad es atribuida a la falta de recursos, aunque muchas veces es por falta de capacitación y conocimientos respecto al tema.

Hay mucha información disponible para mejorar distintos aspectos en el manejo de los esquemas de PT/EQA [39]. Los proveedores de esquemas de PT/EQA locales son dispares. Existen esquemas que cumplen con todo lo que deben cumplir de manera brillante, inclusive algunos han acreditado sus esquemas por la ISO 17043

[4] y otros que tienen mucho por mejorar, por ejemplo, a nivel de la conmutabilidad de sus muestras, el manejo estadístico de los datos y los tiempos [34, 38].

BIBLIOGRAFÍA

1. ISO 15189 (2012) Medical laboratories—Requirements for quality and competence. ISO, Geneva.
2. CLSI GP-27 A2 (2007) Using proficiency testing to improve the clinical laboratory. CLSI, Wayne, PA.
3. Sciacovelli L, Secchiero S, Zardo L, Plebani M The role of the External Quality Assessment. *Biochimica Medica* 2010; 20(2):160-4.
4. ISO/IEC 17043 (2010) Conformity assessment—general requirements for proficiency testing. ISO, Geneva.
5. ISO 13528 (2015) Statistical methods for use in proficiency testing by interlaboratory comparisons. ISO, Geneva.
6. Siekmanna L." Metrological traceability – a concept for standardization in laboratory medicine". *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(5): 953–957.
7. Vesper HW, Thienpont LM. "Traceability in laboratory medicine". *Clin Chem* 2009; 55: 1067–1075.
8. Plebani M "Harmonization in laboratory medicine: the complete picture". *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(4): 741–751.
9. ISO 17511 (2003) In vitro diagnostic medical devices -- Measurement of quantities in biological samples -- Metrological traceability of values assigned to calibrators and control materials. ISO, Geneva.
10. Miller GW, Jones GRD, Horowitz GL, and Weykamp C. "Proficiency Testing/External Quality Assessment: Current Challenges and Future Directions". *Clinical Chemistry* 57:12 (2011).
11. Miller GW, Myers GL, Rej R. "Why Commutability Matters". *Clinical Chemistry* 52, No. 4, 2006.
12. Armbruster D, Miller RR. "The Joint Committee for Traceability in Laboratory Medicine (JCTLM): A Global Approach to Promote the Standardisation of Clinical Laboratory Test Results. *Clin Biochem* 2007; 105- 114.
13. EURACHEM Selection, Use and Interpretation of Proficiency Testing (PT) Schemes. Second edition (2011). EEE-PT WG.
14. Analytical Methods Committee - Robust Statistic Part I & II. *Analyst* 1989; 114, 1693-1702.
15. Thompson, M. and Ellison, S.L.R., "Fitness for purpose – the integrating theme of the revised Harmonised

Protocol for Proficiency Testing in Analytical Chemistry Laboratories". *Accred. Qual. Assur.* 2006;11, 373-378.

16. Tholen, D.W., "Statistical treatment of proficiency testing data". *Accred. Qual. Assur.*, 3 (1998),362-366.
17. Miller WG, Myers GL, Gantzer ML, Kahn SE, Schönbrunner ER, et al. "Roadmap for Harmonization of Clinical Laboratory Measurement Procedures". *Clinical Chemistry* 2011;57:8 1108-1117.
18. IUPAC/CITAC Guide: Selection and use of proficiency testing schemes for a limited number of participants—chemical analytical laboratories (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, Vol. 82, No. 5, pp. 1099–1135, 2010.
19. ISO/IEC Guide 43-1: 1997, Selection and use of proficiency testing scheme by laboratory accreditation bodies.
20. Westgard JO. "Basic QC Practices. Spanish". Translation by GA Migliarino Third Edition. Madison WI, 2010. IISBN 978-1-59425-098-9.
21. Nordtest Report TR 537, Version 3.1 (May 2012), Handbook for Calculation of Measurement Uncertainty in Environmental Laboratories. Nordic Innovation.
22. Ellison SLR and Williams A (Eds). *Eurachem/CITAC guide: Quantifying Uncertainty in Analytical Measurement*, Third edition, (2012) ISBN 978-0-948926-30-3. Available from www.eurachem.org.
23. EUROLAB Technical Report 1/2006. "Guide to the Evaluation of Measurement Uncertainty for Quantitative Test Results". Paris, France.
24. EUROLAB Technical Report 1/2002 –"Measurement Uncertainty in testing". Paris, France.
25. Hyltoft Petersen P, Fraser CG. Strategies to set global analytical quality specifications in laboratory medicine: 10 years on from the Stockholm consensus conference. *Accred Qual Assur* 2010; 15:323–330.
26. Klee GG. Establishment of outcome-related analytical performance goals. *Clin Chem* 2010;56:714–722.
27. CLSI. "Nonconforming Event Management"—Second Edition. CLSI QMS11-A2. Wayne; PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2015.
28. EUROLAB Technical Report 1/2007. "Measurement uncertainty revisited: Alternative approaches to uncertainty evaluation". Paris, France.
29. White GH. Basics of estimating measurement uncertainty. *Clin Biochem Rev* August 2008; 29(Suppl. (i)):S53.
30. BIPM, IEC, IFCC, et al. Evaluation of measurement data—guide to the expression of uncertainty in measurement GUM. JCGM 1002nd Ed. 2008 [<http://www.bipm.org/>].
31. Koch M and Baumeister F. "On the use of consensus means as assigned values". *Accred Qual Assur* 2012;17:395–398.
32. Heydorn K. "The quality of consensus values". *Accred Qual Assur* 2013; 18:243–245.
33. Ya L. Xiao, Chuan B. Zhang, Hai J. Zhao, Feng F. Kang, Wei Wang, Kun Zhong, Shuai Yuan, Zhi G. Wang. "Application of ISO 13528 robust statistical method for external quality assessment of blood glucose measurements in China". *Accred Qual Assur* 2014; 19:397–401.
34. Gun-Munro J. "The challenges and benefits of implementing the requirements of ISO/IEC 17043 by PT/EQA providers". *Accred Qual Assur* 2012; 17:363–370.
35. Srnková J and Zbiral J. "Comparison of different approaches to the statistical evaluation of proficiency tests". *Accred Qual Assur* 2009; 14:467–471.
36. Patriarca M, Chiodo F, Castelli M, Menditto A. "Estimates of uncertainty of measurement from proficiency testing data: a case study". *Accred Qual Assur* 2006; 11: 474–480.
37. Unsal I, Coskun A, Serteser M, Inal TC, Ozpinar A. "Toward standardization of quality assessment in laboratory medicine by using the same matrix samples for both internal and external quality assessments". *Accred Qual Assur* 2010;15:621–627.
38. Lehmann C. "Accrediting PT/EQA providers to ISO/IEC 17043". *Accred Qual Assur* 2012; 17:371–374.
39. de Albano FM, ten Caten CS. "Proficiency tests for laboratories: a systematic review". *Accred Qual Assur* 2014; 19:245–257.
40. Kang F, Wang W, Zhang CB, Wang ZG. "Establishment of an assigned value and its uncertainty for tumour markers in proficiency testing in China". *Accred Qual Assur* 2013; 18:435–439.
41. Kim SY, Chun S, Lee W and Min WK. "Commutability of proficiency testing (PT): status of the matrix-related bias in general clinical Chemistry". *Clin Chem Lab Med* 2013; 51(8): e169–e173.

Laboratory accreditation in Argentina

María Amelia Acuña¹, Cesar Collino², Gustavo A. Chiabrando²

¹ Agency of Accreditation, Buenos Aires, Argentina

² Faculty of Chemical Sciences, National University of Córdoba, Córdoba, Argentina

ARTICLE INFO

Corresponding author:

María Amelia Acuña, Biochemist
Prof. Técnico Área Laboratorios
Organismo Argentino de Acreditación – OAA
E-mail: macuna@oaa.org.ar

Key words:

accreditation, medical laboratory,
analytical quality

ABSTRACT

Laboratory accreditation is an essential element in the healthcare system since it contributes substantially to decision-making, in the prevention, diagnosis, treatment and follow-up of the health status of the patients, as well as in the organization and management of public healthcare. Therefore, the clinical biochemistry professional works continuously to provide reliable results and contributes to the optimization of operational logistics and integration of a laboratory into the health system. ISO 15189 accreditation, ensures compliance of the laboratory to minimize instances of error through the planning, prevention, implementation, evaluation and improvement of its procedures, which provides skill areas that involve both training undergraduate and graduate professionals in clinical biochemistry.

INTRODUCTION

Historically the clinical laboratory has concentrated on implementing analytical quality by craftsmanship and industriousness of manual measurement procedures. Technological developments and the modular installation of automated equipment and robotics require adaptations and new tools for designing and implementation of internal and external quality control and quality assurance. At the same time, the general biomedical breakthrough of the health status and diseases have also required the clinical analysis laboratory to develop strategies to control the processes involved in the preanalytical and postanalytical stages¹. Altogether, the three stages make up the laboratory processing and its product is the report and interpretation of results with clinical relevance. Thus, each stage requires to be monitored and controlled, and eventually would deliver reliable results that have positive impact on the care of the patient and the efficiency of the health system. There arises the concept of total quality, which views the clinical laboratory: as a comprehensive organization, where “quality is assured in all parts of the laboratory”.

The standard to implement in the clinical laboratory, is the international standard ISO 15189 – Medical laboratories - particular requirements for quality and competence², in their latest improved version 2012, is the product of discussion and consensus of the international scientific community whose guidelines are based on management and technical requirements that ensure the compliance with the laboratory to minimize instances of error through the planning prevention, implementation, evaluation and improvement of its processes. The independent assessment of conformity of their requirements is subject to accreditation bodies around the world that guarantee through the granting of accreditation, that the medical

laboratory meets the requirements of technical competence as well as the management system of quality, which ensure results technically valid, reliable, and timely analyses under the accredited scope.

ARGENTINIAN ACCREDITATION AGENCY

In Argentina, the Argentine accreditation organization - OAA³, as signatory of the multi-lateral recognition agreements in the field of ILAC (International Laboratory Accreditation Cooperation) and IAAC (inter-American accreditation cooperation), implemented this international recognition to accredited medical laboratories⁴. The OAA was created by a Presidential Decree (1474/94)⁵ and, it is a central element in the development of Argentina. Within the process of accreditation and numerous rules of accreditation, the OAA considered essential that medical laboratories were accredited under standard IRAM ISO 15189:2014⁶ (equivalent to the ISO 15189:2012 translated by the Standardization Organization of Argentina), then allows that such laboratories, demonstrating compliance in the analytical quality management system, constitute a group of reference laboratories and laboratories of derivation for the medical laboratories in the country. Pharmaceutical industry requires accredited laboratories for clinical drug trials, clinical follow-up of patients involved in their protocols. Accredited laboratories play a key role, contributing with their results in the monitoring of these patients. Similarly, they also make available this information to the IVD (in vitro diagnostic) and medical technology industry.

Within its activities, OAA collaborates in the development of the model of accreditation for clinical laboratories of other American agencies through training and assessments of training of assessors to strengthen the accreditation of laboratories in the region. In this sense, an

accredited clinical laboratory has an organizational structure in which it is defined the direction and responsibility of staff attending, highlighting the figure of the technical supervisor or quality manager; facilitating the effective and efficient communication of staff within the organization; the availability of resources that allow the optimal development of the preanalytical, analytical and postanalytical activities including procedures pertaining to hygiene and occupational safety. Also, compliance by a medical laboratory of the 10 points of technical requirements (5.1 to 5.10) of the current version of the IRAM ISO 15189, are backed by 15 points developed in the management requirements, these laboratories allow access to a level of performance where the position of the profession through the full implementation of the quality is the daily dynamics of developed actions.

LABORATORY ACCREDITATION PROCESS

In Argentina, laboratory accreditation is a voluntary field unlike in other countries where accreditation is mandatory for the entire scope of laboratory or some of its disciplines. This, along with the challenge to overcome preconceived concepts of quality costs, results in a reduced number of accredited laboratories in relation to the total number of laboratories in the country. In contrast to this, most of the professionals are looking for the reliability of its services having already started in implementing quality in their laboratories, with management standards or progressive compliance of quality programs supported by the IRAM ISO 15189.

However, the application of the IRAM ISO 15189 standard requires, at least in Argentina, to promote areas of skills that involve both, undergraduate and graduate professionals in clinical biochemistry to create a “culture of total quality” led within the conceptual framework of the own standard. In this sense, the Republic of

Argentina within the framework of the law on higher education (Law 24.521; Decree 268/95)⁷ in its article 43 establishes that titles defining the profession regulated by the State “which might compromise the public interest by putting at risk in a direct way the health, safety,... require in addition to the daily work load, what the preceding article is referring; then the following requirements should be addressed: (a) the curricula should take into account the basic curricular contents and criteria about the intensity of the practical training that establishes the Ministry of culture and education, in agreement with the Council of universities; (b) the respective careers shall be credited periodically by the National Commission for University evaluation and accreditation or by private entities established to that end duly recognized.” In this sense, Biochemistry or Clinical Biochemistry titles issued by Argentine universities are included in the article 43 of the Act. To do this, this career must meet certain standards established by the National Ministry of education based on five dimensions; one of these dimensions is the own study plan of the university career⁸. In this strategy, one of those core curricular aspects are in analytical chemistry and clinical analysis content, addressing other aspects of metrology, traceability, uncertainty, method verification, quality and quality assurance, requirements which are referred to the technical requirements within the standard IRAM ISO 15189.

UNDERGRADUATE AND GRADUATE PROGRAMS

At the Faculty of Chemical Sciences of the National University of Cordoba (FCQ-UNC), that issued the title of Biochemist, these contents are taught and developed in the subjects of chemical biological analytical and preparatory decision as part of the professional cycle and applied during the fulfillment of the professional practice⁹. In addition to this training, similar

contents are taught and developed in different courses of specialization in clinical biochemistry, hematology, clinical chemistry, immunology, among others¹⁰. The center of Applied Chemistry (CEQUIMAP) of the FCQ-UNC¹¹ was also one of the first laboratories accrediting standards of quality in the country according to IRAM 301 (equivalent to ISO/IEC 17025). Also, the implementation of the standards ISO 15189 and IRAM 301 in the laboratory, resulted in the training of teaching and scientific criteria of quality, both as technical management, which is translated in an efficient manner at the academic level to the students of undergraduate and graduate levels at this faculty.

CONCLUSION

In Argentina, without a doubt, this formal training developed by the universities of the country would result in naturalization in the implementation of total quality and continuous assurance of quality in clinical laboratories. This would benefit the public health and the society in general. It is undisputed that the first step is already implemented in several laboratories; this is the beginning of the paradigm of transformation of clinical laboratories in Argentina.

REFERENCES

1. Plebani. M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine? Clin. Chem. Lab Med 2006;44(6):750 – 759.
2. ISO 15189: 2012. Medical laboratories, particular requirements for quality and competence.
3. Organismo Argentino de Acreditación - OAA <http://www.oaa.org.ar/>.
4. IAAC Memorandum de Entendimiento (MOU) AD 001, Septiembre 2009.
5. Decreto 1474/94 Sistema Nacional de Normas Calidad y Certificación.
6. IRAM ISO 15189: 2014. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia.
7. Ley Nacional de Educación Superior N° 24521. República Argentina. www.me.gov.ar/consejo/cf_leysuperior.html.
8. Res. MECYT N°565/04 - Estándares de acreditación título Lic. en Bioquímica o Bioquímica. <http://www.coneau.edu.ar/archivos/557.pdf>.
9. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.fcq.unc.edu.ar/bioquimica>.
10. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba. Escuela de Posgrado. <http://posgrado.fcq.unc.edu.ar/>.
11. Centro de Química Aplicada – CEQUIMAP – Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.cequimap.com.ar/>.

Accreditación de laboratorios clínicos en Argentina

María Amelia Acuña¹, Cesar Collino², Gustavo A. Chiabrando²

¹ Organismo Argentino de Acreditación, Buenos Aires, Argentina

² Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

Bioq. María Amelia Acuña
Prof. Técnico Área Laboratorios
Organismo Argentino de Acreditación – OAA
Correo electrónico: macuna@oaa.org.ar

Palabras clave:

acreditación, laboratorio clínico,
calidad analítica

RESÚMEN

El laboratorio clínico es un eslabón fundamental en el equipo de salud pues contribuye de manera sustancial en la toma de decisiones en la prevención, diagnóstico, tratamiento y seguimiento del estado de salud de los pacientes, así como en la organización y gestión de los sistemas de salud pública. Es por ello que el profesional bioquímico se capacita de manera continua para proporcionar resultados confiables y aportar en la optimización de las estructuras que conforman la logística del funcionamiento e integración de un laboratorio clínico a este sistema de salud. La acreditación ISO 15189, asegura con su cumplimiento que el laboratorio minimice las instancias de error mediante la planificación, prevención, ejecución, evaluación y mejora de sus procesos, lo que proporciona ámbitos de capacitación que involucren tanto la formación de grado como de posgrado de profesionales en Bioquímica Clínica.

INTRODUCCIÓN

Históricamente el laboratorio clínico se ha abocado a implementar la calidad analítica debido a lo artesanal y laboriosidad de los procedimientos manuales de medición, los cuales producto de la evolución tecnológica y la instalación modular de equipamiento automatizado y la robótica, fue requiriendo adaptaciones y nuevas herramientas de diseños e implementación de controles de calidad internos y externos, así como de aseguramiento de la calidad. A su vez, el avance biomédico general de los estados de salud y enfermedad han requerido también que el laboratorio de análisis clínico profundice estrategias de control de los procesos que intervienen en las etapas preanalíticas y post-analíticas¹. En conjunto, las tres etapas conforman el proceso de medición y su producto es el informe e interpretación de resultados con interés clínico. Por ende, cada etapa requiere ser atendida con estrategias de control y de esta manera lograr resultados confiables que impacten de manera positiva en el cuidado del paciente y en la eficiencia del sistema de salud. De allí surge el concepto de calidad total, el cual permite la apertura de la nueva concepción del laboratorio clínico: como organización integral, en donde *“todos aseguran la calidad en todas partes del laboratorio”*.

Un estándar a medida del laboratorio clínico, la norma internacional ISO 15189 - Laboratorios de análisis clínicos – Requisitos para la calidad y la competencia², en su última versión mejorada 2012, es el producto de la discusión y consenso de la comunidad científica internacional cuyos lineamientos se basan en requisitos de gestión y técnicos que aseguran con su cumplimiento que el laboratorio minimice las instancias de error mediante la planificación, prevención, ejecución, evaluación y mejora de sus procesos. La evaluación independiente de conformidad de sus requisitos, está sujeta a los organismos de

acreditación del mundo quienes garantizan mediante el otorgamiento de la acreditación, que el laboratorio clínico cumple los requisitos de competencia técnica así como los del sistema de gestión de calidad, los cuales aseguran resultados técnicamente válidos, confiables y oportunos de los análisis bajo el alcance acreditado.

ORGANISMO ARGENTINO DE ACREDITACIÓN

En Argentina, el Organismo Argentino de Acreditación – OAA³, como firmante de los acuerdos de Reconocimiento Multilaterales en el ámbito de ILAC (Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios) y de IAAC (Cooperación Interamericana de Acreditación), traslada este reconocimiento internacional a los laboratorios clínicos acreditados⁴. El OAA fue creado por Decreto presidencial (1474/94)⁵ y constituye un elemento central en el desarrollo de Argentina. Dentro del proceso de acreditación de numerosas normas de acreditación, el OAA considera fundamental contar con laboratorios clínicos acreditados bajo norma IRAM ISO 15189:2014⁶ (versión equivalente a la ISO 15189:2012 traducida por el Organismo de Normalización de Argentina), pues posibilita que estos laboratorios, con demostrable cumplimiento de calidad analítica sustentada en la gestión, constituyan un grupo de laboratorios de consulta y receptores de derivación de los laboratorios del país. La Industria Farmacéutica requiere para los estudios clínicos de los medicamentos, el seguimiento clínico de los pacientes involucrados en sus protocolos, el laboratorio clínico acreditado reviste un papel fundamental, ya que contribuye con sus resultados en el monitoreo de estos pacientes. De igual forma, también aportan con la industria de IVD (*in vitro diagnostic*) y Tecnología Médica. Dentro de sus actividades, OAA colabora en el desarrollo del modelo de acreditación para

laboratorios clínicos de otros organismos de América mediante capacitación y evaluaciones con entrenamiento de evaluadores para fortalecer la acreditación de laboratorios clínicos de la región. En este sentido, un laboratorio clínico acreditado cuenta con una estructura organizativa en la cual está definida la responsabilidad de la Dirección y de todo el personal actuante resaltando la figura de Director Técnico y Responsable de calidad; la comunicación efectiva y eficaz de todo el personal dentro de toda la organización; la disponibilidad de recursos que permiten el desarrollo óptimo de las actividades preanalíticas, analíticas y postanalíticas en condiciones adecuadas de higiene y seguridad laboral. Asimismo, el cumplimiento por parte de un laboratorio clínico de los 10 puntos de requisitos técnicos (5.1 hasta 5.10) de la actual versión de la IRAM ISO 15189, soportados por los 15 puntos desarrollados en los requisitos de gestión, permiten a estos laboratorios acceder a un nivel de funcionamiento donde la jerarquización de la actividad profesional a través de la aplicación integral de la calidad es la dinámica diaria de acciones desarrolladas.

PROCESO DE ACREDITACIÓN DE LABORATORIOS CLINICOS

En Argentina, la acreditación de los laboratorios clínicos es un campo voluntario a diferencia de otros países en los que la acreditación es obligatoria para todo el alcance de laboratorio o para algunas disciplinas. Esto junto a que aún constituye un desafío poder franquear conceptos preconcebidos de los costos de la calidad, resulta en que aún es reducida la cantidad de laboratorios acreditados en relación al total de laboratorios existentes en el país. En contraposición con esto, la mayoría de los profesionales bioquímicos en búsqueda de la confiabilidad de sus servicios ya han iniciado el camino de implementar calidad en sus laboratorios, con estándares de gestión o programas progresivos

de cumplimiento de calidad sustentados en la IRAM ISO 15189.

No obstante, la aplicación de la normativa IRAM ISO 15189 requiere, al menos en Argentina, propiciar ámbitos de capacitación que involucren tanto la formación de grado como de posgrado de profesionales en Bioquímica Clínica orientados a crear una “cultura de calidad total” propiciado dentro del marco conceptual de la propia norma. En este sentido, la República Argentina dentro del marco de la Ley de Educación Superior (Ley 24.521; Decreto 268/95)⁷ en su Art. 43 establece a aquellos títulos que definen profesiones reguladas por el Estado “*cuyo ejercicio pudiera comprometer el interés público poniendo en riesgo de modo directo la salud, la seguridad, se requerirá que se respeten, además de la carga horaria a la que hace referencia el artículo anterior, los siguientes requisitos: a) Los planes de estudio deberán tener en cuenta los contenidos curriculares básicos y los criterios sobre intensidad de la formación práctica que establezca el Ministerio de Cultura y Educación, en acuerdo con el Consejo de Universidades; b) Las carreras respectivas deberán ser acreditadas periódicamente por la Comisión Nacional de Evaluación y Acreditación Universitaria o por entidades privadas constituidas con ese fin debidamente reconocidas.*” En este sentido, los títulos de Bioquímica o Bioquímica Clínica expedidos por las Universidades argentinas están comprendidos en el Art. 43 de la mencionada Ley. Para ello, esta carrera debe cumplir con determinados estándares fijados por el Ministerio de Educación de la Nación basados en cinco dimensiones, siendo una de estas dimensiones el propio Plan de Estudio de la carrera universitaria⁸. En esta dimensión, uno de los aspectos troncales del plan de estudio son los contenidos en química analítica y análisis clínicos, abordando aspectos metrológicos, trazabilidad, incertidumbre, verificación de métodos, requisitos de calidad y

aseguramiento de la calidad, los cuales son contemplados dentro de los requisitos técnicos en la norma IRAM ISO 15189.

PROGRAMAS DE GRADO Y POSTGRADO

En la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba (FCQ-UNC), quien expide el título de Bioquímico, estos contenidos son dictados y desarrollados en las asignaturas Química Biológica Analítica y Practicanato Preparatorio del Ciclo Profesional y aplicados durante el cumplimiento del Practicanato Profesional⁹. Sumada a esta formación de grado, contenidos similares son dictados y desarrollados en diferentes carreras de Especialización en Bioquímica Clínica, tales como Química Clínica, Hematología, Inmunología, entre otras¹⁰. Además el Centro de Química Aplicada (CEQUIMAP) de la FCQ-UNC¹¹ fue uno de los primeros laboratorios universitarios en acreditar normas de calidad en el país, acreditando según IRAM 301 (equivalente a ISO/IEC 17025). Asimismo, la implementación de las normas ISO 15189 y la IRAM 301 en el laboratorio, redundó en la capacitación de personal docente y científico en criterios de calidad, tanto de gestión como técnico, lo cual es traducido de manera eficiente a nivel académico a los estudiantes de las carreras de grado y posgrado de esta facultad.

CONCLUSION

En Argentina, sin lugar a dudas, esta capacitación formal desarrollada a través de las universidades del país tendrá como resultado una

naturalización en la aplicación de la calidad total y aseguramiento continuo de la calidad en los laboratorios de análisis clínicos. Esto redundará en beneficio de la salud pública y la sociedad en general. Es indiscutible que el primer paso ya está dado para muchos laboratorios, y que este es el comienzo del paradigma de la transformación de los laboratorios clínicos en Argentina.

BIBLIOGRAFÍA

1. Plebani. M. Errors in clinical laboratories or errors in laboratory medicine?, Clin. Chem. Lab Med 2006;44(6):750 – 759.
2. ISO 15189: 2012. Medical Laboratories, particular requirements for quality and competence.
3. Organismo Argentino de Acreditación - OAA <http://www.oaa.org.ar/>.
4. IAAC Memorandum de Entendimiento (MOU) AD 001, Septiembre 2009.
5. Decreto 1474/94 Sistema Nacional de Normas Calidad y Certificación.
6. IRAM ISO 15189: 2014. Laboratorios clínicos. Requisitos particulares para la calidad y la competencia.
7. Ley Nacional de Educación Superior N° 24521. República Argentina. www.me.gov.ar/consejo/cf_leysuperior.html.
8. Res. MECYT N°565/04 - Estándares de acreditación título Lic. en Bioquímica o Bioquímica. <http://www.coneau.edu.ar/archivos/557.pdf>.
9. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.fcq.unc.edu.ar/bioquimica>.
10. Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba. Escuela de Posgrado. <http://posgrado.fcq.unc.edu.ar/>.
11. Centro de Química Aplicada – CEQUIMAP – Facultad de Ciencias Químicas Universidad Nacional de Córdoba. <http://www.cequimap.com.ar/>.

The accreditation experience of clinical laboratories and blood banks in Mexico

Sandra Quintana

President, Clinical Committee, Mexican Accreditation Entity (EMA)

Autonomous University of Guerrero, Mexico

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Sandra Quintana Ponce, MSc.
President, Clinical Committee
Mexican Entity of Accreditation (ema, a.c.)
Autonomous University of Guerrero (UAGro)
Mexico
E-mail: bioclin@icloud.com

Key words:

accreditation, clinical laboratory, blood bank

ABSTRACT

The accreditation of clinical laboratories and blood banks based on ISO 15189 is now being consolidated in Mexico, and is coordinated by the Mexican accreditation entity innovative strategies, A.C. (ema) and supported by the activities of the committee of clinical laboratories and blood banks. The active participation in working groups formed by the technical committee of clinical laboratories and blood banks in specific areas, has contributed to the formulation of technical documents and criteria of evaluation that strengthen the current accreditation scheme. The national registry of evaluation (PNE) consists of technical experts and evaluators from different disciplines of clinical laboratory; the evaluators actively participate in accreditation assessment, with an ultimate goal to receive training and feedback for continuous improvement of its own performance.

INTRODUCTION

Accreditation in Mexico under the ISO 15189 standard is being implemented as a culture of quality that seeks the systematization and the reliability of the systems of quality management of clinical laboratories and blood banks, with international requirements of technical competence, recognized and functionally suitable for its operation. Accreditation assessment considers the system of quality management and technical competence as: competence of the personnel, methods validated and verified, traceability of measurements, calibration and maintenance of equipment, environment for carrying out the tests, assurance of the quality of the results, handling and transportation of samples and all the stages of the analytic process¹. Accreditation is the formal and public recognition by an impartial body and third party of the technical competence and reliability of a clinical laboratory and blood bank, to provide services through compliance with the requirements set out in the ISO 15189 standard. In Mexico the responsible organization for evaluation that confers recognition is the Mexican accreditation entity, A.C. (ema)².

PROCESS OF ACCREDITATION IN MEXICO

ema began operating on January 15, 1999, with the permission of 9 units of the Federal Executive, which issued the official Mexican standards of enforcement, as such forming the basis for accreditation by Mexico's privately run, non-profit organization⁴. The main aim of this professional body is to promote reliability and provide expertise on conformity. It emerged when Mexico was negotiating the Treaty of free trade in North America (TLCAM: United States, Canada and Mexico) with subsequent reform of the Federal law of metrology and standardization. Previously this role was carried out by the

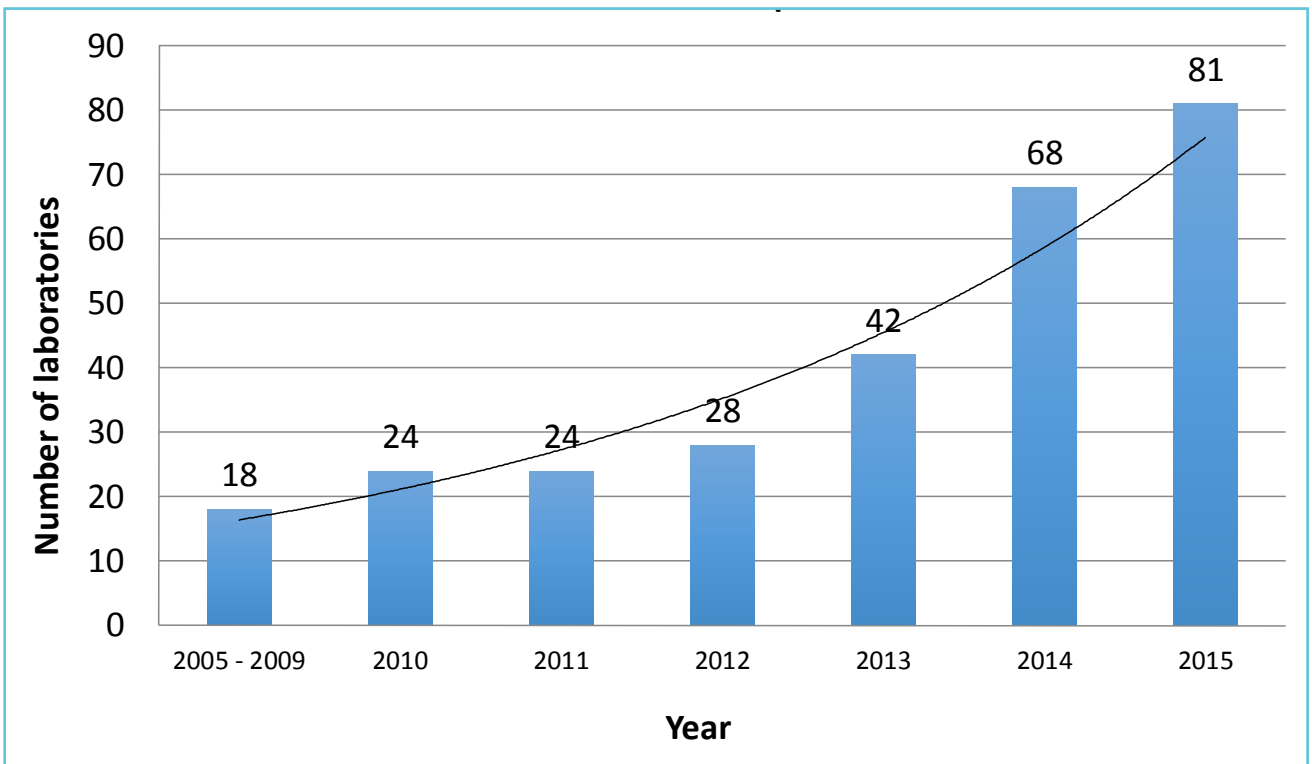
Federal Government through the General direction of rules of the Minister of Economy³.

IMPLEMENTATION OF THE MEXICAN VOLUNTARY STANDARD FOR THE ACCREDITATION OF MEDICAL LABORATORIES AND BLOOD BANKS

Services of evaluation and accreditation for clinical laboratories and blood banks under the ISO 15189 standard, approved by the Mexican norm NMX-EC-15189-IMNC, began in 2005, and until 2009 credited 18 clinical laboratories, and by 2012 had another 28 clinical laboratories and 2 accredited blood banks. In search of new strategies for the growth of the sector, it promotes accreditation under this international standard. Currently there are 4 blood banks and 81 accredited clinical laboratories (see Figure 1.) following a second-order polynomial growth, as shown in the equation presented in the same graph. Mexico is ranked second in the Americas, as regards to the number of accredited laboratories: This is in contrast to Canada, which has 184 accredited clinical laboratories, where accreditation is mandatory³.

COMMITTEE ON MEDICAL LABORATORIES AND COMMITTEE OF BLOOD BANK LABORATORIES

The Committee on clinical laboratories and the Committee from blood banks, which are made up of heterogeneous group of stakeholders and experts in the field, was set up to decide upon the evaluation criteria. The committees gather monthly to determine and develop evaluation criteria, furthermore develop guidelines and protocols for verification; currently its working groups have formed: the guideline for the quality control of quantitative methods in the clinical laboratory and the guideline for validation and verification of qualitative methods, furthermore they are involved in updating other documents. In January of this year, they started updating

Figure 1 Number of clinical laboratories accredited in Mexico per year

the guide of traceability metrology of the values assigned to calibrators and control employed by the clinical laboratory. This material was prepared in conjunction with the National Center of Metrology (CENAM), while the guideline for the validation and the verification of the quantitative test used by clinical laboratory procedures is also under review⁶. In Mexico, the labs have guidelines that allow them to understand, implement and comply with accreditation criteria, facilitating the preparation of the accreditation process by the ISO 15189 standard⁷.

NATIONAL REGISTRY OF ASSESSORS

For audit and evaluation purposes a team of evaluators has been conceived. This panel of evaluators is the national registry of appraisers (PNE)⁷, currently consisting of 5 leading evaluators, 8 evaluators, 8 evaluators in training and 44 technical experts. To streamline the accreditation process there is a strategic plan for the

formation of a group of leading technical assessors and technical assessors.

Assessors and technical experts receive ongoing training by *ema*, with online training, through the system of educational administration (SADE), with courses and in-person workshops; some of which are mandatory and essential to the permanence in PNE and the allocation of assessments. The SADE is a tool available to all members of the PNE, as one of the benefits of its services and participation; courses are assigned, according to the area in question, in order to acquire or strengthen their knowledge, either to increase their level of qualification within the PNE, or to use as query or update mechanism. Also included is the assessment of performance, attention to complaints, congratulations and monitoring reports.

In addition, meetings, courses and workshops are organized with providers of clinical laboratories and blood banks, who have offices or

representations in Mexico looking for informed and above all approved criteria based on ISO 15189. This is also done with providers of proficiency testing⁸ of programs accredited on the basis of the ISO 17043.

The accredited laboratory must comply with guidelines related to programs of proficiency testing, which are embodied in a document of the *ema* known as: fitness testing policy. This document requires laboratories to participate in proficiency testing that meet ISO/IEC17043 Guide: 2010 (NMX_EC:17043 - IMNC - 2010). Currently it comprises 5 programs of proficiency tests accredited by the institution in the area of clinical laboratories and blood banks. Also laboratories have the opportunity to participate in any other international programs that are recognized by a mutual recognition agreements in which *ema* is a signatory.

QUALIFYING CLINICAL AND BLOOD BANK LABORATORY DISCIPLINES

The *ema* provides accreditation in the disciplines of: hematology and coagulation, clinical chemistry, immunology and immunochemistry, microbiology, mycology and bacteriology, parasitology, urinalysis, pathology, cytopathology, molecular biology, histocompatibility and genetics, toxicology, flow cytometry and transfusion medicine. Having the largest number of accredited disciplines: clinical chemistry (60), immunology and immunochemistry (55), hematology and coagulation (33) and urinalysis (28)⁹.

WORKING GROUP OF ACCREDITED LABORATORIES AND ACCREDITED BLOOD BANKS

Laboratories accredited periodically receive feedback and update, some of them work in a program known as: adopt a lab, which consists of an accredited laboratory adopting to another that is not, in order to support it with advice,

paving the way for its accreditation. Also participating in some other activities to promote accreditation and the transparency in the process, such as the Organization of the first inter-American Congress for the accreditation of clinical laboratories, blood banks and hematopoietic progenitor cells in August 2015, where the slogan was: “delivering confidence to the sector health and social care”, which highlights the importance of accreditation in the sector health.

In Mexico, the international version of upgraded ISO 15189:2012 was translated and approved by the Instituto Mexicano de normalización y certificación A.C., and it issued the Declaration of validity in the Official Gazette from May of 2015, under the name NMX-EC-15189-IMNC-2015¹⁰.

INTERNATIONAL RECOGNITIONS

The accreditation of clinical laboratories and blood banks under the standard ISO 15189 in Mexico, is supported by all the international players in the field of accreditation¹¹, which are: the International Forum of Accreditation (IAF), the International Laboratory Accreditation Cooperation (ILAC), Inter-American Cooperation of Accreditation (IAAC), the Laboratory Accreditation Cooperation of Asia Pacific (APLAC) and the Cooperation of Accreditation of the Pacific (PAC)¹².

Thus, the function of *ema* is comparable with the entities of Spain (ENAC), Canada (SCC), United States (ANAB), Japan (JAB), Brazil (INMETRO), Argentina (OAA) and France (COFRAC), among others. The *ema* works continuously to improve the technical competence of the accredited staff, evaluators and colleagues, innovating with new evaluation, accreditation and training services.

ACTIVITIES BEYOND EMA

Mexico celebrated, on the 9th of June 2015, the world accreditation day with an academic event where it recognized different sectors and clinical

laboratories for its outstanding contributions to the accreditation of proficiency testing and blood banks. The slogan of the day was “giving confidence to the health sector and social care”.

CONCLUSION

Accreditation in clinical laboratories and blood banks in Mexico is a reality that increasingly attracts a good number of laboratories. Its growth is based on the implementation of a culture of quality for the improvement and continuous training of all stakeholders.

REFERENCES

- 1 NMX-EC-15189-IMNC-2015/ISO15189:2012. Laboratorios Clínicos-Requisitos de la calidad y competencia. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A. C. México.
- 2 López- Martínez, M.I., (2007). La acreditación en México, sus primeros años. Normalización y Certificación Electrónica, NYCE, A. C. México.
- 3 Quintana-Ponce, S. (2008). De la Certificación ISO 9001:2000 a la Acreditación ISO 15189: 2003 en los Laboratorios clínicos. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias del Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro). Guerrero, México.
- 4 López-Martínez, M.I. (2015, agosto). Mitos y realidades de la Acreditación en México. Ponencia realizada en el Congreso Interamericano de Acreditación de laboratorios clínicos, bancos de sangre y de Células Progenitoras Hematopoyéticas. Entidad Mexicana de Acreditación. México. D.F.
- 5 Entidad Mexicana de Acreditación & CENAM., (2015). Guía de Trazabilidad Metrológica de los Valores Asignados a los Calibradores y Material de Control Empleados por el Laboratorio Clínico. México.
- 6 Entidad Mexicana de Acreditación & CENAM., (2008). Guía para la Validación y la Verificación de los Procedimientos de Examen Cuantitativos Empleados por el Laboratorio Clínico. México.
- 7 Mexican Accreditation Entity (2015). Medical Laboratories. Assesors List, 15189. <http://www.ema.org.mx/portal/> julio 2015.
- 8 Manual of Procedures. Proficiency Testing Policy. http://200.57.73.228:75/pqtinformativo/GENERAL/Carpetas_1_Procedimientos_y_Políticas/Politica_Ensayos_Aptitud/MPCA002_Politica_Ensayos_Aptitud_2.pdf/.
- 9 Mexican Accreditation Entity (2015). Accredited Medical Laboratories Catalog. <http://www.ema.org.mx/portal/>
10. Diario Oficial de la Federación, 2015.
- 11 Sierra-Amor, R. et al. (2008). Acreditación de Laboratorios Clínicos ISO 15189:2003. Bioquímica. Vol. 33: 3, pp 109-114.
- 12 Mexican Accreditation Entity (2014). Recognitions. Portfolio of Services. México.

Experiencia en la acreditación de laboratorios clínicos y bancos de sangre en México

Sandra Quintana

Presidenta del Comité de Clínicos de la Entidad Mexicana de Acreditación (ema)

Universidad Autónoma de Guerrero, México

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

M en C Sandra Quintana Ponce
Presidenta, Comité de clínicos
Entidad Mexicana de Acreditación (ema)
Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro)
México
Correo electrónico: bioclin@icloud.com

Palabras clave:

acreditación, laboratorio clínico,
banco de sangre

RESÚMEN

La acreditación de los laboratorios clínicos y bancos de sangre en base a ISO 15189 se está consolidando ahora en México, siendo impulsado por las estrategias innovadoras de la Entidad Mexicana de Acreditación, A.C. (ema) y, apoyado por las actividades de los comités de laboratorios clínicos y bancos de sangre. La participación activa de los comités técnicos de laboratorios clínicos y bancos de sangre conformados en grupos de trabajo específicos, ha contribuido para la elaboración de documentos técnicos y criterios de evaluación que fortalecen el esquema actual de la acreditación. El Padrón Nacional de Evaluadores (PNE), conformado por expertos técnicos de diferentes disciplinas del laboratorio clínico, evaluadores y evaluadores líderes, participa activamente en las evaluaciones de acreditación, recibiendo formación y retroalimentación permanentemente, para la mejora continua de su desempeño. Actualmente se cuenta con programas nacionales de ensayos de aptitud acreditados en base a NMX-EC-17043-IMNC-2010 ISO/IEC 17043:2010, que permiten cumplir con la política de ensayos de aptitud para los laboratorios clínicos y bancos de sangre acreditados por la norma ISO 15189. La ema cuenta con todos los reconocimientos internacionales en materia de acreditación

ISO 15189 colocando a México, como el segundo país en las Américas, con el mayor número de laboratorios acreditados.

INTRODUCCIÓN

La acreditación en México bajo la norma ISO 15189, se ha implementado como una cultura de calidad que busca la sistematización y la confiabilidad de los sistemas de gestión de la calidad de los laboratorios clínicos y bancos de sangre con requisitos internacionales de competencia técnica, reconocidos y adecuados para su operación. La evaluación de la conformidad considera el sistema de gestión de la calidad y la competencia técnica, como: competencia del personal, métodos validados y verificados, trazabilidad de las mediciones, calibración y mantenimiento de equipo, medio ambiente para la realización de los exámenes, aseguramiento de la calidad de los resultados, manejo y transporte de muestras y todas las etapas del proceso analítico¹. Precizando que, la acreditación es el reconocimiento formal y público, por un organismo imparcial y de tercera parte de la competencia técnica y confiabilidad de un laboratorio clínico y banco de sangre y proporcionar los servicios a través del cumplimiento con los requisitos establecidos en la norma ISO 15189. En el caso de México, la responsable de la evaluación que otorga el reconocimiento es la Entidad Mexicana de Acreditación, A.C. (*ema*)².

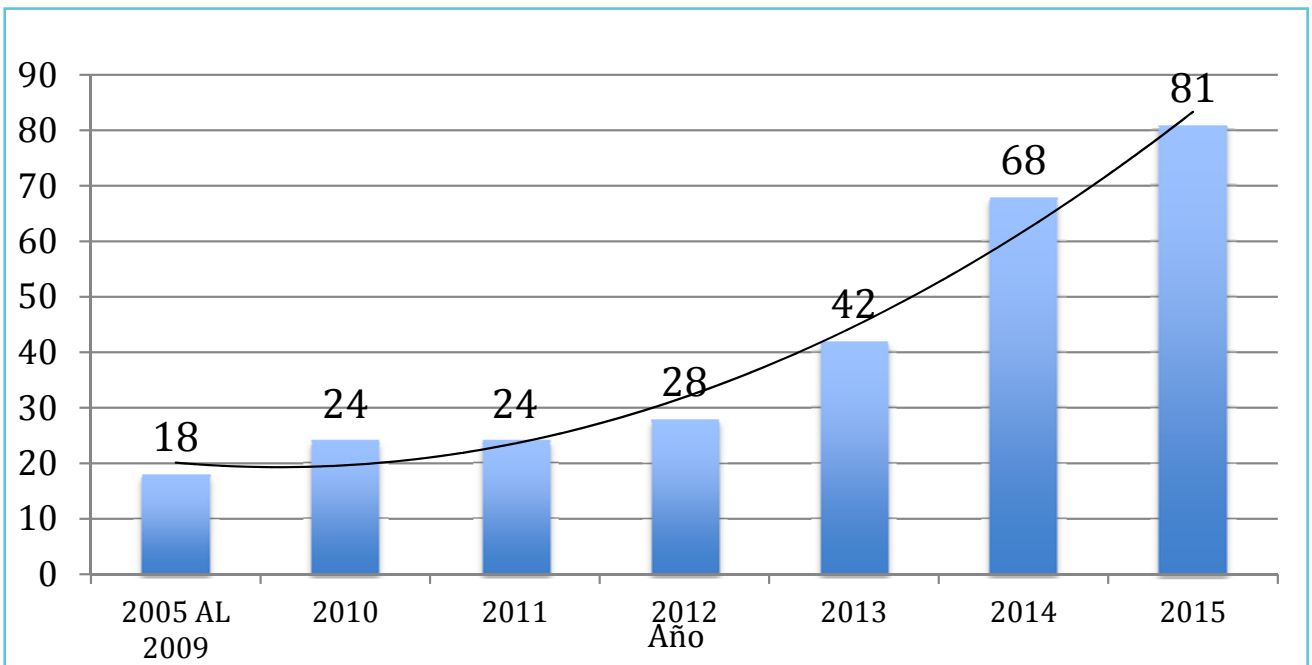
PROCESO DE ACREDITACION EN MEXICO

La *ema*, inicia operaciones el 15 de enero de 1999, con la autorización de 9 dependencias del Ejecutivo Federal, que emiten las Normas Oficiales Mexicanas de cumplimiento obligatorio, creándose como la entidad acreditadora en México, de gestión privada, asociación civil sin fines de lucro, imparcial, incluyente y profesional, teniendo como principal función la de acreditar, promoviendo la confiabilidad

y competencia técnica de los organismos de evaluación de la conformidad surgiendo como una alternativa a la necesidad de responder a los cambios en el mercado exterior, ya que para esas fechas México se encontraba negociando el tratado internacional de libre comercio de América del Norte (TLCAM: Estados Unidos, Canadá y México) con la consecuente reforma de la Ley Federal de Metrología y Normalización. Anteriormente, quien realizaba la acreditación de los Organismos de Evaluación de la Conformidad era el Gobierno Federal a través de la Dirección General de Normas de la Secretaría de Comercio y Fomento Industrial (hoy Secretaría de Economía)³. La adopción del estándar internacional ISO 15189, cobra singular importancia en estos momentos en que la informática y la comunicación han llegado a todos los sectores y usuarios de los servicios de laboratorio clínico y bancos de sangre, los cuales se encuentran mejor informados acerca del servicio que reciben; buscando garantías, que proporcionen confianza y certidumbre en los resultados proporcionados, evitando así controversias médicas, éticas e incluso legales⁴.

IMPLEMENTACION DE LA NORMA MEXICANA VOLUNTARIA PARA LA ACREDITACION DE LABORATORIOS CLINICOS Y BANCOS DE SANGRE

Los servicios de evaluación y acreditación para laboratorios clínicos y bancos de sangre bajo la norma ISO 15189, homologa a la norma mexicana NMX-EC-15189-IMNC, se inicia en 2005, al amparo del Subcomité de Química y del Comité de Laboratorios de Ensayo y es hasta el año 2009 cuando se acreditan a 18 laboratorios clínicos, que paulatinamente para el año 2012 sumaban 28 laboratorios clínicos y 2 bancos de sangre acreditados. En busca de nuevas estrategias para el crecimiento de este sector, la *ema* promueve de manera importante la acreditación bajo esta norma internacional.

Figura 1 Número de laboratorios clínicos acreditados en México por año

Actualmente se cuenta con 4 bancos de sangre y con 81 laboratorios clínicos acreditados (ver Figura 1.) colocándose así en el segundo lugar en las Américas después de Canadá que cuenta con 184 laboratorios clínicos acreditados, y donde la acreditación es obligatoria, a diferencia de México, en donde es voluntaria³.

COMITÉ DE LABORATORIOS CLÍNICOS Y COMITÉ DE BANCO DE SANGRE

Para la elaboración de los criterios de evaluación y para dictaminar, se cuenta con el Comité de Laboratorios Clínicos y el Comité de Bancos de Sangre respectivamente, los cuales están conformados de forma heterogénea por las diferentes partes interesadas y por expertos en la materia, que se reúnen mensualmente para dictaminar, elaborar criterios de evaluación, desarrollar guías y protocolos de verificación; actualmente se han conformado grupos de trabajo que están desarrollando, entre otros documentos, la Guía para el Control de la Calidad de Métodos Cuantitativos en el Laboratorio Clínico

y la Guía de Validación y Verificación de Métodos Cualitativos. En enero de este año se actualizó la Guía de Trazabilidad Metrológica de los Valores Asignados a los Calibradores y Material de Control Empleados por el Laboratorio Clínico (Entidad Mexicana de Acreditación y CENAM⁵, elaborada en conjunto con el Centro Nacional de Metrología (CENAM), estando en revisión la Guía para la Validación y la Verificación de los Procedimientos de Examen Cuantitativos Empleados por el Laboratorio Clínico⁶. Por lo que los laboratorios clínicos mexicanos, cuentan con guías técnicas gratuitas que les permiten comprender, implementar y cumplir con criterios de acreditación, facilitándoseles la preparación del proceso de acreditación en base a la versión vigente de ISO 15189.

PADRON NACIONAL DE EVALUADORES

Para realizar las evaluaciones, se tiene conformado un equipo de evaluadores calificados en ISO 15189 y expertos técnicos en las diferentes disciplinas en las que se acredita. Este panel de

evaluadores constituye el Padrón Nacional de Evaluadores (PNE)⁷ constituido actualmente por 5 evaluadores líder, 8 evaluadores, 1 evaluador técnico, 8 evaluadores técnicos en entrenamiento y 44 expertos técnicos. Actualmente, se está realizando un plan estratégico para la formación de un grupo de evaluadores técnicos y evaluadores técnicos líderes, para optimizar el proceso de acreditación.

Los evaluadores y expertos técnicos reciben capacitación continua por parte de la *ema*, en línea, a través del Sistema de Administración Educativa (SADE), con cursos y talleres presenciales; algunos de los cuales son obligatorios y esenciales para la permanencia en el PNE y la asignación de evaluaciones. El SADE es una herramienta disponible para todos los integrantes del PNE, como uno de los beneficios por su capacitación y participación; los cursos son asignados, según el área en la cual se encuentran calificados con la finalidad de adquirir y/o reforzar sus conocimientos, ya sea para incrementar su nivel de calificación dentro del PNE, o para utilizarlo como mecanismo de consulta o actualización. También se les aplican evaluaciones de desempeño, atención de quejas, felicitaciones y supervisión de informes.

Además, se organizan reuniones, cursos o talleres con proveedores de laboratorios clínicos y bancos de sangre, que tienen sedes o representaciones en México buscando informar y sobre todo homologar criterios, con base en ISO 15189. Lo anterior también se realiza con proveedores de ensayos de aptitud de los programas acreditados en base a la norma ISO 17043.

PARTICIPACION EN ENSAYOS DE APTITUD

El laboratorio acreditado debe cumplir con lineamientos en relación a los programas de ensayos de aptitud, los cuales están plasmados en un documento conocido como: Política de

Ensayos de Aptitud, dentro del manual de procedimientos de ensayos de aptitud⁸. En este documento se menciona los ensayos de aptitud aceptados por la *ema*, entre los cuales se encuentra los programas acreditados bajo la norma ISO/IEC17043:2010 (NMX-EC-17043-IMNC-2010). Actualmente se cuenta con 5 programas de ensayos de aptitud acreditados para el área de laboratorios clínicos y bancos de sangre. Adicionalmente, los laboratorios tienen la oportunidad de participar en otros programas nacionales, como los publicados por el CENAM y por otros institutos nacionales de metrología signatarios de reconocimiento mutuo. Así como también programas internacionales, organizados por proveedores de ensayos de aptitud acreditados por organismos de acreditación signatarios de acuerdos de reconocimiento mutuo.

DISCIPLINAS DE LABORATORIO CLINICO Y BANCO DE SANGRE ACREDITABLES

La *ema* ofrece la acreditación en las disciplinas de: hematología y coagulación, química clínica, inmunología e inmunoquímica, microbiología, micología y mico-bacteriología, parasitología, urianálisis, anatomía patológica, citopatología, biología molecular, histocompatibilidad y genética, toxicología, citometría de flujo y medicina transfusional. Teniendo el mayor número de acreditados en las disciplinas de: química clínica (60 laboratorios), inmunología e inmunoquímica (55), hematología y coagulación (33) y urianálisis (28)⁹. Recientemente, se inician los Programa de Acreditación de Point of Care Testing (exámenes cerca del paciente) y el Programa de Acreditación de Bancos de Células Troncales Hematopoyéticas. Encontrándose en formación el Programa de Acreditación de Laboratorios de Imagenología.

GRUPOS DE TRABAJO DE LABORATORIOS CLINICOS Y BANCOS DE SANGRE ACREDITADOS

Los laboratorios acreditados periódicamente reciben retroalimentación y actualización, algunos de ellos trabajan en un programa conocido como: adopta un laboratorio, que consiste en que un laboratorio acreditado adopta a otro que no lo está, con la finalidad de apoyarle con asesoría, allanándole el camino a la acreditación. Participando también en algunas otras estrategias para impulsar la acreditación y la transparencia en el proceso, como la organización del primer Congreso Interamericano para la Acreditación de Laboratorios Clínicos, Bancos de Sangre y de Células Progenitoras Hematopoyéticas realizado en agosto de 2015, donde el lema fue: “entregando confianza al sector salud y cuidado social”, lo que pone de manifiesto la importancia de la acreditación en el sector salud.

Para la actualización de la tercera versión internacional de la norma ISO 15189:2012, el Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A.C, como en años anteriores, convocó en diciembre del 2013 a expertos en la materia, sociedades científicas y universidades, quienes trabajaron aproximadamente durante un año en la traducción y homologación de esta norma, la cual terminó a finales del 2014, emitiéndose la declaratoria de vigencia en el Diario Oficial de la Federación en mayo del 2015, bajo la denominación NMX-EC-15189-IMNC-2015¹⁰.

RECONOCIMIENTOS

En 2005, la *ema* solicitó la evaluación ante la Cooperación Asia-Pacífico de Acreditación de Laboratorios (APLAC, por sus siglas en Inglés) para el reconocimiento del programa de acreditación de laboratorios clínicos en el ámbito internacional, la evaluación fue realizada en el 2006 obteniéndose como resultado cero no

conformidades y algunas recomendaciones, consiguiendo en abril de 2007, ser uno de los 8 países firmantes del primer acuerdo de reconocimientos internacional en el área de laboratorios clínicos¹¹.

Actualmente, La acreditación de los laboratorios clínicos y bancos de sangre está respaldada por todos los reconocimientos regionales e internacionales en materia de acreditación como son: el Foro Internacional de Acreditación (IAF), la Cooperación Internacional de Acreditación de Laboratorios (ILAC), la Cooperación Interamericana de Acreditación (IAAC), la Cooperación de Acreditación de Laboratorio de Asia Pacífico (APLAC) y la Cooperación de Acreditación del Pacífico (PAC)¹². De esta forma, la función de *ema* es equiparable con las entidades de España (ENAC), Canadá (SCC), Estados Unidos (ANAB), Japón (JAB), Brasil (INMETRO), Argentina (OAA) y Francia (COFRAC), entre otras. La *ema* trabaja continuamente para mejorar la competencia técnica de los acreditados, el personal, los evaluadores y órganos colegiados, innovando con nuevos servicios de evaluación, acreditación y capacitación.

ACTIVIDADES EXTRAMUROS

México celebra el 9 de junio el día mundial de la acreditación con un evento académico, donde reconoce a diferentes sectores, en este año se reconoció a los laboratorios clínicos, programas de ensayos de aptitud y bancos de sangre destacados por sus aportaciones a la acreditación. La eficiente labor de la dirección estratégica de la *ema*, ha favorecido el reconocimiento de la norma ISO 15189; incluyendo, desde los laboratorios clínicos y bancos de sangre, hasta las autoridades federales y otros organismos reguladores nacionales.

CONCLUSIÓN

La acreditación en los laboratorios clínicos y bancos de sangre en México bajo el estándar internacional ISO 15189, es una realidad que cada vez reúne a un mayor número de laboratorios que comparten la búsqueda de la excelencia, sustentando su crecimiento en la implementación de una cultura de calidad cimentada en la capacitación y la mejora continua, de todas las partes interesadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. NMX-EC-15189-IMNC-2015/ISO15189:2012. Laboratorios Clínicos-Requisitos de la calidad y competencia. Instituto Mexicano de Normalización y Certificación A. C. México.
2. López- Martínez, M.I., (2007). La acreditación en México, sus primeros años. Normalización y Certificación Electrónica, NYCE, A. C. México.
3. Quintana-Ponce, S. (2008). De la Certificación ISO 9001:2000 a la Acreditación ISO 15189: 2003 en los Laboratorios clínicos. Tesis para obtener el grado de Maestría en Ciencias del Laboratorio Clínico. Facultad de Medicina. Universidad Autónoma de Guerrero (UAGro). Guerrero, México.
4. López-Martínez, M.I. (2015). Mitos y realidades de la Acreditación en México. Ponencia realizada en el Congreso Interamericano de Acreditación de laboratorios clínicos, bancos de sangre y de Células Progenitoras Hematopoyéticas. Entidad Mexicana de Acreditación. México. D.F.
5. Entidad Mexicana de Acreditación & CENAM., (2015). Guía de Trazabilidad Metrológica de los Valores Asignados a los Calibradores y Material de Control Empleados por el Laboratorio Clínico. México.
6. Entidad Mexicana de Acreditación & CENAM., (2008). Guía para la Validación y la Verificación de los Procedimientos de Examen Cuantitativos Empleados por el Laboratorio Clínico. México.
7. Entidad Mexicana de Acreditación (2015). Listado de evaluadores, Laboratorios clínicos 15189. Recuperado de <http://www.ema.org.mx/portal/> julio 2015
8. Manual de procedimientos de ensayos de aptitud. Política. Recuperado de: http://200.57.73.228:75/pqginformativo/GENERAL/Carpeta_1_Procedimientos_y_Politicas/Politica_Ensayos_Aptitud/MPCA002_Politica_Ensayos_Aptitud_2.pdf/.
9. Entidad Mexicana de Acreditación (2015). Catálogo de acreditados. Laboratorios Clínicos. Recuperado de <http://www.ema.org.mx/portal/>.
10. Diario Oficial de la Federación, 2015
11. Sierra-Amor, R. et al, (2008). Acreditación de laboratorios clínicos ISO 15189:2003. Bioquímica. Vol. 33: 3, pp 109-114.
12. Entidad Mexicana de Acreditación (2014). Reconocimientos. Portafolio de servicios. México.

Experience of implementing ISO 15189 accreditation at a university laboratory

Patricia Solis-Rouzant

*Institute for Chemistry, Biology, Biomedicine and Biophysics Research,
Mariano Gálvez University, Guatemala City, Guatemala*

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Patricia Solis-Rouzant, MSc
Directora de Calidad
Instituto de Investigaciones Químicas,
Biológicas, Biomédicas y Biofísicas
de la Universidad Mariano Gálvez
Guatemala City, Guatemala
3a. Avenida 9-00 zona 2
Interior Finca el Zapote
Phone: 24111800 ext. 1291
E-mail: psolis@umg.edu.gt
Web: <http://iiqbbb.umg.edu.gt/>

Key words:

accreditation, university laboratory
and quality management system

ABSTRACT

The present article summarizes the authors' experience with the implementation of a quality management system based on ISO 17025 and ISO 15189 standards at university laboratories. The accreditation of the analytical procedures at the Universidad Mariano Gálvez represented a challenge due to the unique nature of an educational institution and the difference in nature to the standards implemented. Sample handling and care of the patient were combined to achieve an integrated management system. We explain the development of the management system, the obstacles and benefits of the system and concluding that it is possible to design a management system based on ISO 15189 for the university lab that allowed delivering results assuring technical competence to patient care and welfare.

INTRODUCTION

Private Guatemalan universities are based on three pillars, academic, research, and private services. Among their principal areas and against the lack of any other entity that provides technical support, everyday universities are even prominently involved in services that are provided in response to national needs, as witnessed in other fields related with food safety, environmental pollution tracing, and public health. The task is particularly daunting given the fact that government funding is limited, which makes almost impossible to cover all the public and private sector needs.

Mariano Gálvez University (UMG) is a private institution established in 1966 and is now one of the largest universities in Guatemala by the number of students and institutional locations around the nation. The UMG's Research Institute of Chemistry, Biology, Biomedics and Biophysics (I2QB3) is made up by three main areas: Chemistry Analysis (CA), Biomolecular Analysis (BA) and Clinical Analysis (CIA). Among its main activities are chemical assays in raw material, final products, pharmaceutical products, food, water and vegetable products; particularly with those that involve human samples, such as DNA analysis, genotyping and viral detection, clinical chemistry, immunology, coprology, urology, hematology and bacteriology. Furthermore, the research institute has laboratories equipped for basic laboratory practices linked to career courses provided by UMG.

Unlike private commercial laboratories, I2QB3 laboratories own the latest generation of instrumentation, and this is not the case in other university laboratories due to financial limitations and complex maintenance requirements. Another advantage for I2QB3 is the availability of highly qualified personnel and university support. The performance of the I2QB3 depends on

policy formed by other university bodies which are in charge of personnel, accounting, technical support and management.

MATERIAL AND METHODS

a. Implementation of an integrated quality system at university laboratories

Technical directors at each laboratory began to imply quality assurance from the year 2007, two years after I2QB3 was inaugurated. After facing multitude of difficulties with the accreditation of several analytical procedures, when accreditation was granted in 2012.

The selected analytical procedures were distributed between CA and BA, implying that the nature and function of the procedures made it necessary for implementation of an integrated quality system that included ISO 17025 and ISO 15189 requirements. The challenge of an integrated system in a complex environment such as the university laboratory required hiring consulting services in 2008, which included training and advising in the construction of the quality system. The limited time allotted by the university board led to the recognition for the need to hire personnel to maintain the timely implementation of the management system. A Quality Coordinator was hired and the former Director of CA became the Quality Director. In order to avoid a conflict of interests, The Quality Directorship was created independently from all laboratories.

b. ISO 15189 Component

The I2QB3 started the accreditation process based on ISO 15189 with two molecular biology techniques:

- Genotyping of 37 human papillomavirus genotypes (HPV); and
- Human papillomavirus genotypes detection of high and low risk.

The decision to start with the analysis of human papillomavirus detection came from the General Director's vision to provide to Guatemalan physicians the latest generation of tools for preventing and detecting cervical cancer. These tests combined with the Papanicolaou staining contributed to diminishing the disease and according to the Pan-American Health Organization (PAHO) was the number one cause of death in Guatemalan women, for both indigenous and rural populations^{1, 2}.

To cover all the needs of medical interactions, pharmaceutical entities and patients, a scientific advisor was hired whose main role was to provide consulting for the best choice of services offered by the I2QB3.

Personnel responsible for the performance of the analyses were hired mainly for the aforementioned aim and with the additional tasks that included research and academic support. The analyses listed in the accreditation process were highly specific and those were not performed in any other laboratory in Guatemala; thus, the technical staff developed proficiency skills in parallel with the development and verification of the methods.

RESULTS

During the quality system implementation, the re-modeling of the buildings to improve the customer service started, to improve the reception and collection of the sample by health professionals trained for this task, but also physicians were included.

One of the greatest challenges was the low volume of samples, which hindered the monitoring and corrective actions procedures. Another challenge was import and access to reagents, equipment and technical support in Guatemala. The fact that the I2QB3 performs unique assays in the country causes the I2QB3 to get just one provider in terms of equipment, reagents and

technical support: at times, the services were not as effective as one would expect; this was also true for the leading corporations in the world.

More recently, besides at UMG, there are only two entities accredited under the ISO 15189 standard, and both are private hospital laboratories. For this reason, the users (physicians, patients and regulatory entities) of services from clinical laboratories, utilizing ISO 15189 practices are still in the process of establishing the value of the quality and understanding the benefits of the usage of accredited services. In addition of the challenge of communicating and making the population understand the value of the quality management system, the users had to get used to accepting and respecting the terms and conditions of accredited laboratories. The requirements in the analyses demands, the sample handling and the information & results formats. Situations in the beginning of the quality system management implementation process that were more difficult to get accepted by the customers were those involving the terms and conditions.

During the years since the accreditation was obtained and with continuous improvements that facilitated the development of new technologies around the world, which are based on the development of the references materials for the human papillomavirus genotype 16 and 18 by the National Institute for Biological Standards and Control (NBSC) in collaboration with the World Health Organization (WHO)³. Furthermore, the availability of the proficiency testing assays from the American Pathology College (CAP) allowed for improving the mechanisms to assure the quality of results⁴.

In 2013, the transition to ISO 15189 published in 2012 was performed. At this point, counting on an integrated management system turned out to be a good advantage that facilitated the

transition. Some requirements and documented procedures of the new ISO 15189 version were already considered a part of the ISO 17025.

CONCLUSIONS

The experience of the accreditation process under the ISO 15189, for the first university laboratory and for the accredited Guatemalan organization under two standards within an integrated quality management system, confirmed the benefits and is now counted on as a quality management system in laboratories for the improvement of the efficiency and effectiveness of analysis processes. Despite the difficulties that Guatemala comes across to offer services of international quality, it is possible to design a quality management system that allows delivery to patient of their results of analyses with the warranty and technical proficiency of the

procedures, and as such forwarding the care and wellbeing back to the patient.

REFERENCES

1. Arrossi, S., Sankaranarayanan, R., & Parkin, D. M. (2003). Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Pública de México*, 45(3), 306-314.
2. World Health Organization. (2015). Guatemala: Prevención y tratamiento del cáncer del cuello uterino. Retrieved from: http://www.paho.org/esp/index.php?option=com_content&view=article&id=671:guatemala-prevencion-y-tratamiento-del-ca%C2%A1ncer-del-cuello-uterino&Itemid=497, 2015.
3. National Institute for Biological Standards and Control. (2015). Retrieved from 1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV): <http://www.nibsc.org/documents/ifu/06-202.pdf>, 2015.
4. Zapata-García, D., Llauradó, M., & Rauret, G. (2007). Experience of implementing ISO 17025 for the accreditation of a university testing laboratory. *Accreditation and Quality Assurance*, 12(6), págs. 317-322.

Experiencia en la implementación de la acreditación ISO 15189 en un laboratorio universitario

Patricia Solis-Rouzant

*Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas,
Universidad Mariano Gálvez, Guatemala, Guatemala*

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

Lic. Q. M G C Patricia Solis-Rouzant
Directora de Calidad
Instituto de Investigaciones Químicas,
Biológicas, Biomédicas y Biofísicas
de la Universidad Mariano Gálvez
Guatemala, Guatemala
3a. Avenida 9-00 zona 2
Interior Finca el Zapote
Teléfono: 24111800 ext. 1291
Correo electrónico: psolis@umg.edu.gt
Web: <http://iiqbbb.umg.edu.gt/>

Palabras clave:

acreditación, laboratorio universitario,
sistema de gestión.

RESÚMEN

Se presenta la experiencia en la implementación de un sistema de gestión de calidad integrado de las normas ISO 17025 e ISO 15189 en laboratorios universitarios. La acreditación de los análisis realizados en la Universidad Mariano Gálvez representó un reto debido a las circunstancias particulares de una institución educativa y a la diferencia en la naturaleza de ambas normas; en donde el manejo de la muestra y la atención del paciente se combinaron en un sistema sólido de gestión integrada. Aquí se explica el desarrollo del sistema de gestión, los obstáculos y los beneficios del sistema, concluyendo que es posible diseñarlo basado en ISO 15189 en un Laboratorio Universitario permitiendo entregar los resultados del análisis con la garantía de competencia técnica en función del cuidado y bienestar del paciente.

INTRODUCCIÓN

Las Universidades privadas en Guatemala desarrollan en diferente proporción tres funciones básicas: Docencia, Investigación y Servicios. Entre ellas se pueden diferenciar por destacar en áreas particulares, tales como las ciencias exactas, las ciencias aplicadas e ingenierías, las ciencias económicas y las ciencias agrícolas. Dentro de estas áreas de liderazgo y ante la falta de otras entidades que proporcionen apoyo técnico, las universidades se ven cada vez más involucradas en la prestación de servicios en función de necesidades nacionales como el apoyo a exportadores en temas de inocuidad de alimentos, monitoreo de contaminación ambiental y en temas de salud pública. Los limitados recursos gubernamentales destinados a laboratorios nacionales hace casi imposible cubrir todas las necesidades del sector privado y público.

La Universidad Mariano Gálvez (UMG) es una institución educativa privada fundada en 1966, actualmente es una de las más grandes por la cantidad de alumnos y la cobertura de áreas que otorgan en Guatemala. Dentro de la UMG, se encuentra el Instituto de Investigaciones Químicas, Biológicas, Biomédicas y Biofísicas (I2QB3) que cuenta con tres áreas técnicas principales: Laboratorios de Análisis Químicos (LAQ), Laboratorios de Análisis Biomolecular (LAB) y Laboratorio de Análisis Clínico (LAC). Entre sus principales actividades están la realización de ensayos químicos en materias prima, productos terminados, productos farmacéuticos, alimenticios, agua y productos vegetales. Los análisis de muestras para detección de mutaciones genéticas, la identificación humana por ADN, la detección y genotipificación de virus, la química clínica, la inmunología, la copro-urología, la hematología y la bacteriología. Además se cuenta con varios laboratorios equipados para prácticas básicas de laboratorio asociadas a los cursos de las carreras que ofrece la UMG.

A diferencia de los laboratorios privados comerciales, los laboratorios del I2QB3 cuentan con equipo analítico de vanguardia cuya disponibilidad es limitada para laboratorios privados debido al alto costo de adquisición y mantenimiento. Otra ventaja significativa es el número mayor de personal altamente calificado y el respaldo académico universitario. El personal lo conforman coordinadores docentes, profesionales especializados, personal administrativo y personal de apoyo.

El funcionamiento del I2QB3 depende de la interacción con otras unidades de la UMG encargadas del personal, la contabilidad, el soporte técnico, donde todas las decisiones de compra son autorizadas por el Consejo Directivo de la Universidad. Esta estructura compleja y burocrática conlleva a tener tiempos de respuesta mayores que en los laboratorios privados comerciales y procesos de gestión más complejos.

MATERIAL Y MÉTODOS

a. Implementación de un sistema integrado de gestión de calidad en laboratorios universitarios

Los profesionales encargados de cada área técnica iniciaron el trabajo en aseguramiento de calidad en el año 2007, dos años después de la apertura del I2QB3. Transcurridos dos años se centraron los esfuerzos en la acreditación de varios análisis, logrando la Acreditación en el 2012.

Los análisis que se decidieron acreditar estaban distribuidos entre el LAQ y el LAB lo cual implica que la naturaleza y función de los análisis hacía necesario la implementación de un sistema integrado que incluyera la Norma ISO 17025 y la Norma ISO 15189. El reto de un sistema integrado en un ambiente complejo como el de un laboratorio universitario requirió la contratación de un servicio de consultoría que inició en el 2008 la cual consistió en capacitaciones y

orientación sobre la construcción del sistema de gestión. La disponibilidad de tiempo del personal directivo dedicado a la construcción del sistema de gestión fue una limitante que impidió seguir en tiempo la consultoría, reconociendo que era necesario la contratación de personal para dar seguimiento a la implementación, por lo cual se contrató a un coordinador de calidad y se designó al director del LAQ como director de calidad. Más adelante, y para evitar conflictos de interés se creó la dirección de calidad independiente de cualquier laboratorio en la universidad.

b. Componente ISO 15189

El I2QB3 inició la acreditación en base a ISO 15189 para dos análisis basados en técnicas de biología molecular para uso diagnóstico:

- Genotipificación de 37 genotipos del virus de papiloma humano; y
- Detección de genotipos del virus de papiloma humano de Alto y Bajo riesgo.

El material utilizado para estas dos pruebas es tejido cérvicouterino.

La decisión de iniciar con estos análisis para la detección del virus de papiloma humano surgió entre otros, por la visión del director general del I2QB3 de proporcionar al médico guatemalteco herramientas vanguardistas en la prevención y detección temprana del cáncer de cérvix, las cuales combinadas con el Papanicolaou contribuyeran a la disminución del cáncer del cuello uterino, que según información de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) es la principal causa de muerte por cáncer ginecológico en las mujeres guatemaltecas, afectando principalmente a poblaciones indígenas y rurales^{1,2}.

Dado que la UMG no cuenta con hospital universitario propio y donde la carrera de medicina contaba con menos de 10 años de existencia, la UMG aún no tenía la experiencia en los

servicios del área de ciencias médicas en donde la calidad gira en torno al cuidado y bienestar del paciente. Para suplir la necesidad de interacción con los médicos, las casas farmacéuticas y con los pacientes, se contrató a un asesor científico cuyo rol principal fue la dar servicios de asesoría respecto a la selección y al uso de los servicios que ofrece el I2QB3.

Los profesionales responsables de la realización de los análisis son contratados principalmente para este fin, con responsabilidades adicionales que incluían el apoyo a la investigación y la docencia. Los análisis que quedaron dentro del alcance de la acreditación son altamente específicos y no se realizaban en ningún otro laboratorio en Guatemala, por lo tanto el personal técnico fue desarrollando las competencias necesarias y paralelamente al desarrollo y la verificación del método.

RESULTADOS

Durante la implementación del sistema de gestión de calidad se empezó la remodelación de instalaciones para mejorar la atención del público en general, tanto para la recepción de las muestras tomadas por un médico ginecólogo o por otro profesional de la salud capacitado para ello, así como para la atención de pacientes que necesitaran toma de muestra en las instalaciones del laboratorio.

Uno de los principales obstáculos que fueron enfrentados durante la implementación del sistema de gestión de calidad fue el bajo volumen de muestras que ingresaba para su análisis, dificultando la verificación de la efectividad de las mejoras y de acciones correctivas. Otra dificultad importante fue el acceso en Guatemala a la compra de reactivos, equipos y servicio técnico. Al realizar estos análisis de manera exclusiva en el país, donde en la mayoría de los casos solo se cuenta con proveedores únicos de reactivos, equipos y servicio técnico, y quienes

en ocasiones no cumplen con el servicio deseado, aun cuando fueran grandes casas comerciales de renombre internacional, la dificultad de cobertura fue un reto que se tuvo que vencer para reducir el impacto en la calidad del servicio otorgado al paciente.

Actualmente, además de la UMG solo existen dos instituciones Guatemaltecas acreditadas bajo la norma ISO 15189, ambas son laboratorios de hospitales privados. Es por ello que los usuarios de estos servicios de laboratorio clínico, médicos, pacientes y entidades regulatorias aún se encuentran en proceso de valorar la calidad y comprender los beneficios de usar servicios de laboratorio acreditados bajo ISO 15189. Además del reto de comunicar y hacer entender la importancia de los sistemas de gestión de calidad en laboratorios, los usuarios han tenido que acostumbrarse a respetar las políticas de los laboratorios acreditados, los requisitos en la solicitudes de análisis, en la manipulación de muestras, la información y el formato de los informes de resultados, situaciones que al inicio hicieron más difícil la aceptación de un sistema de gestión de calidad.

Durante los años posteriores a la obtención de la acreditación, la mejora continua se facilitó mediante el desarrollo de nuevas tecnologías de nivel mundial, como el desarrollo de materiales de referencia para el virus del papiloma humano genotipo 16 y 18 por el National Institute for Biological Standards and Control en colaboración con la Organización Mundial de la Salud (OMS)³. Además, la disponibilidad de ensayos de aptitud del Colegio Americano de Patología (CAP) ha permitido mejorar los mecanismos de aseguramiento de la calidad de los resultados⁴.

En el 2013 se inició la transición a la versión vigente de la ISO 15189, situación en la cual el contar con un sistema integrado de gestión

fue una ventaja fundamental facilitando la transición ya que algunos requisitos y procedimientos documentados de la nueva versión de ISO 15189 habían sido considerados en base a ISO 17025.

CONCLUSIONES

La experiencia en la acreditación ISO 15189 por el primer laboratorio universitario y de la primera organización guatemalteca acreditada bajo dos normas en un sistema integrado de gestión de calidad, confirman los beneficios de contar con un sistema de gestión de calidad en laboratorios para la mejora de la eficacia y la eficiencia de los procesos de análisis. A pesar de las dificultades que enfrenta Guatemala para ofrecer servicios de análisis de calidad internacional, es posible diseñar un sistema de gestión que permita entregar al paciente resultados de análisis con la garantía de la competencia técnica por la cual fueron realizados y en función del cuidado y bienestar del paciente.

BIBLIOGRAFÍA

1. Arrossi, S., Sankaranarayanan, R., & Parkin, D. M. Incidence and mortality of cervical cancer in Latin America. *Salud Pública de México*, 2003; 45(3), 306-314.
2. World Health Organization. Guatemala: Prevención y tratamiento del cáncer del cuello uterino. Obtenido de: http://www.paho.org/esp/index.php?option=com_content&view=article&id=671:guatemala-prevencion-y-tratamiento-del-ca%C2%A1ncer-del-cuello-uterino&Itemid=497, 2015.
3. National Institute for Biological Standards and Control. Obtenido de 1st WHO International Standard for Human Papillomavirus (HPV): <http://www.nibsc.org/documents/ifu/06-202.pdf>, 2015.
4. Zhao, C., Moriarty, A. T., Ghofrani, M., Husain, M., Tambouret, R. H., Laucirica, R., Crothers, B. A.. Human Papillomavirus Testing and Reporting Rates in 2012: Results of a College of American Pathologists National Survey. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 2015; 139(6), 757-761.

Quality control in screening for infectious diseases at blood banks. Rationale and methodology

Amadeo Sáez-Alquezar¹, Pedro Albajar-Viñas², André Valpassos Guimarães¹,
José Abol Corrêa¹

¹ Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ)/Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC),
Rio de Janeiro, Brazil

² Department of Control of Neglected Tropical Diseases, World Health Organization, Genève, Switzerland

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Dr. Amadeo Sáez-Alquezar
Programa Nacional de Controle
de Qualidade (PNCQ)/Sociedade
Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)
Rio de Janeiro, Brazil
E-mail: amadeo62@gmail.com

Key words:

internal quality control, external quality
control, infectious diseases, screening,
blood banks, qualitative tests.

ABSTRACT

Quality control procedures are indispensable to ensure the reliability of the results provided by laboratories responsible for serological screening in blood banks. International recommendations on systems of quality management classify as a top component the inclusion of two types of control: (a) internal quality control (IQC) and (b) external quality control (EQC). In EQC it is essential to have, at least, a monthly frequency of laboratory assessment. On the other hand, IQC involves the daily use of low-reactivity control sera, which should be systematically added in all run, carried out in the laboratory for each parameter. Through the IQC analysis some variations in the criteria of run acceptance and rejection may be revealed, but it is of paramount importance to ensure the previous definition of these criteria and even more importantly, the adherence to them; and that corresponds to the validation of analytical runs of each test. Since 2010 this has been, for instance, the experience of the PNCQ*, developing external quality control programmes on serology for blood banks. These programmes use samples of lyophilized sera well-characterized for the reactivity related to the parameters used for the serological screening of

blood donors. The programmes have used blind panels of six samples for monthly assessments. In the last 50 assessments, which involved 68 blood banks in Brazil, a significant number of instances of non-compliance were observed in all monthly assessments. These results provide strong support to the recommendation of systematic monthly assessments.

(*) *National Quality Control Programme (PNCQ)*

INTRODUCTION

Serological screening for infectious diseases in blood banks currently includes qualitative serological testing for HIV, HTLV, HCV, HBV and syphilis. Anti-*T.cruzi* screening is also conducted in Latin American countries where Chagas disease is endemic. It is recommended that NAT (nucleic acid testing) for HIV, HBV and HCV be used in parallel with serological screening to reduce the risk of transmission during the immunological window period.

Serological screening involves the use of sensitive and specific tests, employing the ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) and CLIA (chemiluminescence immunoassay) methodologies in most cases. The platforms used are automated so that a large volume of samples can be covered in a short timeframe, thereby ensuring easier processing of results¹.

All serological tests used in screening are qualitative and should be accompanied by quality control procedures that are appropriate for this kind of test and guarantee the quality of the end results.

Quality control procedures are necessary to ensure the quality of the results originating from laboratories responsible for serological screening. International and national recommendations indicate that quality management systems must necessarily adopt at least two types of controls: (a) internal quality controls and (b) external quality controls¹⁻⁴.

External quality controls entail participation in at least one external quality assessment (EQA) programme using well-characterized panels that contain specimens for all screening parameters and enable assessments to be conducted at least once a month.

Since the late 1990s, with assistance from the Pan American Health Organization (PAHO), reference laboratories at blood banks in most Latin American countries have started participating in serology quality control programmes; many have assumed the role of organizing centres for the internal development of such programmes in their respective countries⁵⁻¹¹. This tradition of participating in external quality assessment (EQA) programmes is continuing to date, largely in response to the requirements contained in national regulations and recommendations of international institutions. *While not all programmes have the same features, in general they do not feature monthly assessments.*

In so far as the adoption of internal quality control for the use of low-reactivity control sera is concerned, while national regulations do recommend their use, few visible results have been obtained and there appears to be little consistency in the procedures and rules to be adopted.

This report aims to present the most appropriate procedures for the development of external quality control programmes and implementation of internal quality control, with a focus on the qualitative serological testing used to screen blood donors.

INTERNAL QUALITY CONTROL

According to the Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI), an analytical run is the time interval in which a series of measurements are taken in a stable manner in terms of precision and accuracy, taking account of any adverse effects that should be detected appropriately¹².

Internal quality control involves the daily use of low-reactivity control sera, which should be added in all runs, carried out in the laboratory for each parameter.

It is important to remember that each laboratory is responsible for validating its own internal control programme in order to meet basic requirements within its performance parameters. The importance of standardizing the usage and acceptance criteria for the daily use of low-reactivity internal control sera (ICS) must also be taken into account. It must be made very clear that ICS are different to the positive or negative control sera included in diagnostic kits. ICS may be prepared in the laboratories themselves or, preferably, acquired from suppliers specializing in the manufacture of such products.

ICS should be routinely used in the laboratory every day to monitor the performance of each test, as they help to validate analytical runs. The number, frequency and extent of the controls involved will depend on the number and magnitude of the analytical runs. ELISA tests involving microplates use a positive and a negative ICS for each routine microplate. The use of one positive ICS for every 100 or 200 specimens is recommended for continuous flow equipment.

Each ICS should be initially adjusted for use with each specific test. The reactivity criteria shown in Table 1 have been adopted in most laboratories in Latin America¹.

When ICS are prepared in-house, adjustments (dilutions) should be made in order to achieve the reactivity index within the established range. In the case of sourcing from suppliers, most of whom prepare the sera individually for each commercial brand, the values are seldom correct and it is often necessary to make adjustments by diluting the product in order to achieve the desired values. Obviously, this will only be possible when the reactivity values exceed the limits of the chosen range.

After obtaining reactivity values within the chosen range, it is recommended that the ICS be stored at -20° in small volume aliquots for daily use. It is therefore possible to avoid any loss of reactivity that occurs when larger aliquots are stored in refrigerators for several days. Standardization will be performed for each of the positive ICS chosen for each parameter and for each methodology. Twenty tests will be conducted to obtain the mean standard deviation and the coefficient of variation. The transformation of these data into Standard Deviation Units (Z score) makes it possible to discard extreme values (outliers) in the 20 determinations by applying the Grubbs test¹³, and facilitates the plotting of the Levey-Jennings graph¹⁴, which will subsequently be used to enter the daily ICS values.

The Levey-Jennings graph yields the successive control values and facilitates daily analysis of the behaviour of ICS within the decision limits: ± 1 SD, ± 2 SD and ± 3 SD. This analysis provides evidence of any deviations from expectations by demonstrating trends (systematic errors) or any dispersion in the results (random errors), in addition to unexpected results which may indicate changes in the reagent batches or significant changes in the equipment.

Daily variations in ICS are best analysed by using some of the Westgard rules¹⁵. At least three of these, considered "alert" rules (12s, 22s, 41s), facilitate the identification of trends that can be corrected in a timely manner. Two of the rules, considered being "control" rules (1_{3s} and 10x) indicate that the run presented significant changes that are liable to jeopardize the results, which should not therefore be accepted.

Positive as well as negative ICS should be used. The reactivity acceptance criteria for the negative ICS are shown in Table 1. The standardization and application procedures in the Levey-Jennings graph are the same as for positive ICS,

Table 1 Low-reactivity Internal Control Sera (ICS) to monitor daily runs in laboratories carrying out serological screening of blood donors

Positive ICS	
Index: Reading value/cut-off value	>1.0
Recommended range	2.0 – 4.5
Index for competitive assays	>1.0
Recommended range	0.3 – 0.7
Negative ICS	
Index: Reading value/cut-off value	>1.0
Recommended range	<0.8
For competitive assays	>2.0

with this sole difference, that the Westgard rules are not used to analyse daily performance. It is important only that the consistency of the (always negative) results around the mean be verified.

As stated above, each laboratory is responsible for validating its own internal control programme in order to meet the basic requirements within its performance parameters. By analysing the behaviour of the ICS, the acceptance and rejection criteria of the runs may exhibit some variation, but the most important consideration is that these criteria should be defined and still more importantly adhered to. *This is the validation of the analytical runs of each test.*

In practice, it is quite common for variations to occur between different batches of the same test from the same manufacturer. If these variations are very significant, they may directly affect the results of the specimens under analysis. In this happens, regulations in some countries recommend that, where batches of diagnostic kits need to be changed, the laboratory should conduct an assessment to ensure that the new batch performs as well as the previous one³. Less significant variations are nearly always

observed when batches are changed. It must be therefore made clear that when a change occurs, the positive ICS that were previously used must be re-standardized.

Serum panels are used to assess diagnostic kits before they pass into routine use and when changing batches to verify that they perform as well as the previous batch: *Validation of batches of kits before use and batch-by-batch validation². The final recommendations for the use of internal quality control are shown in Table 2.*

EXTERNAL QUALITY CONTROL OR EXTERNAL QUALITY ASSESSMENT (EQA) PROGRAMMES

This refers to an external assessment of laboratory performance to ensure that the procedure is capable of verifying the quality of the results. In general, EQA programmes are developed by leading institutions or suppliers of specific products to ensure quality. These bodies are known as organizing centres (OC). Participation in EQAs may be voluntary or mandatory. Voluntary participation implies individual professional responsibility, since it shows that those in charge of the participating laboratories wish to understand and improve their performance. The

Table 2 Recommendations on internal quality control at laboratories carrying out serological screening of blood donors

Positive ICS should be adjusted for each test within the established reactivity criteria

ICS must be used in all analytical runs and the findings incorporated into the Levey-Jennings graph for daily analysis

Minimum acceptance criteria must be established and applied to validate the daily runs

Standardization of positive ICS must be repeated when diagnostic kits are changed

Whenever possible, it is also recommended that new batches of diagnostic kits be assessed using sera panels with well-characterized reactive and non-reactive specimens (batch-by-batch assessment)

drawback is that only those laboratories that are concerned about their performance are assessed. When participation is obligatory, the data obtained through each programme are more valid because the assessment encompasses all the laboratories in the network (state, country, etc.). Nevertheless, the fact that participation is obligatory is no guarantee that the information will be exploited to the maximum or that services will be improved, because not all participating laboratories will make full use of all the information generated in each programme^{1,14}.

EQA programmes use blind panels of serum specimens sent by the organizing centre to all participating laboratories (PLs). These specimens must be well characterized by different commercial tests for each parameter, and reactive specimens should be confirmed through supplementary tests. While it is impossible to characterize the specimens using all the tests on the market for assays of each parameter, it is nevertheless recommended that the tests most frequently used in the region be employed, and that the most widespread methodologies are applied, namely ELISA and CLIA.

As for the use of EQA programmes to assess the performance of screening at blood banks, it is

advisable that blind panels should contain specimens with variable reactivity for all screening parameters to ensure an exact reproduction of routine screening conditions. It is also possible to use blind sera panels for just one parameter, which frequently occurs in anti-*T. cruzi* screening in countries that are not endemic for Chagas disease.

The best way to obtain the specimens for the panels is to use *plasma units*, which have been discarded because they have demonstrated reactivity to one of the serological screening parameters. These units of plasma are transformed into serum through a process involving recalcification and subsequent dialysis or filtration. Each unit of serum should be characterized before the panels are prepared.

In some situations, dilutions will have to be made to obtain the quantity of specimens needed to carry out the programmes, since all PLs must receive the same specimens to ensure proper analysis and comparison of the end results. Dilution limits exist for each parameter to ensure that the specimens maintain their reactivity properties for all screening tests and for any supplementary tests used to confirm positivity.

The OC of an EQA programme is responsible for the logistics of preparing and delivering the panels to all participating laboratories (PLs) that should process the samples in the same way as for a routine procedure. The idea is to assess the performance of PLs in cooperative spirit, keeping individual results strictly confidential.

Since the serological tests used for screening are qualitative, potential failures in laboratories' internal processes may give rise to two types of non-compliance: (a) False Reactive Results (FRR) or (b) False Non-Reactive Results (FNRR).

The OC should evaluate the performance of the PL and prepare two types of document: (a) an individual assessment for each PL (confidential) and (b) a final report containing strategic information, e.g. about the characterization of the specimens on the panel, the percentage of FRR and FNRR produced during the programme using each of the tests or methodologies adopted by the PL, and the total number of PL. The data should not be confidential; it should be made available to all PLs, as well as persons responsible for the distribution of diagnostic kits and the competent health authorities concerned. This information is put to best use when the assessments and final reports are analysed and discussed internally. All instances of non-compliance (FRR and/or FNRR) should be documented and discussed in order to pinpoint the

possible cause. Table 3 lists the principal errors observed in the performance of EQAs.

Final recommendations for optimum implementation of internal quality control and participation in external assessment programmes are shown in Table 4.

In the current context of quality control at laboratories, it is considered essential that EQA assessments should be performed at least once a month. Recent studies show that EQA programmes conducted at serology laboratories screening for infectious diseases in blood banks reported instances of non-compliance (FRR and/or FNRR) in practically all months when an assessment was conducted.

The National Quality Control Programme (PNCQ) is the largest supplier of proficiency tests and internal control sera in Brazil. Since 2010, it has developed external quality control programmes in serology for blood banks.

These programmes make use of specimens of lyophilized serum that are very well-characterized for reactivity in reference to the parameters used for the serological screening of blood donors. The programmes use blind panels of six specimens for monthly assessments.

In the last 50 programmes, which involved 68 blood banks in Brazil, a significant number of instances of non-compliance (FRR and/or FNRR)

Table 3 The most common problems observed in EQA programmes at serological screening laboratories attached to blood banks

Problem	Phase
Contamination of samples	Pre-analytical/Analytical
Data transcription errors	Analytical/Post-analytical
Kits insufficiently sensitive or specific	Pre-analytical/Analytical
Inadequate internal quality control procedures	Analytical
Inadequate storage of specimens	Analytical/Pre-analytical

Table 4 Aspects of quality control at laboratories conducting serological screening of blood donors

Participation in at least one EQA programme with monthly assessments

Daily use of (+) and (-) ICS to monitor and validate analytical runs

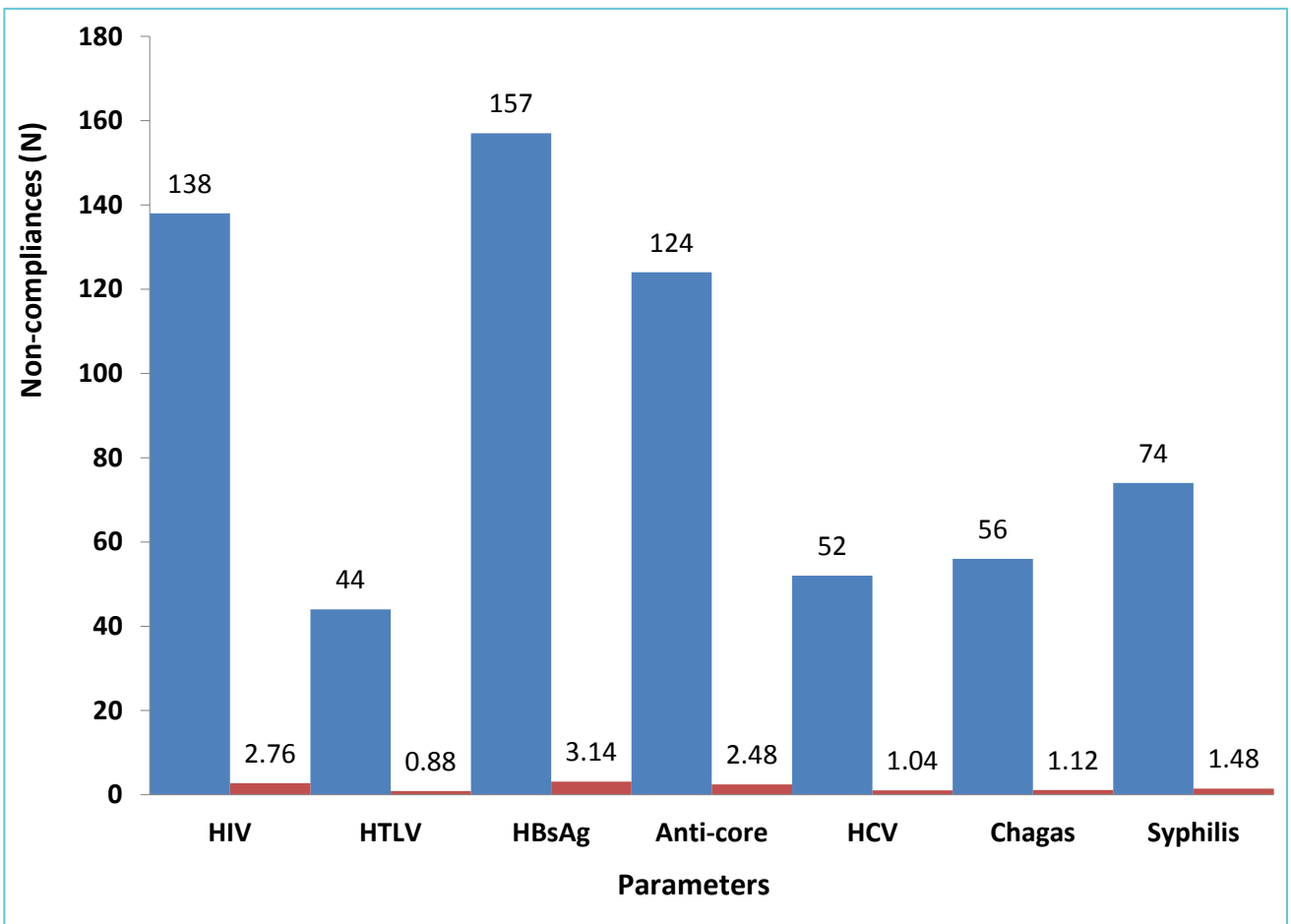
Ongoing training for laboratory technicians

Use of diagnostic kits of proven quality (assessed before use)

Internal quality control of equipment, procedures, diagnostic reagents and comprehensive record of all activities

Regular inspections to ensure compliance with official standards

Figure 1 Total number of instances of non-compliance in monthly evaluation of 50 EQA (blue) and average instances of non-compliance per programme (red)



were observed in all monthly assessments (Figure 1), thus adding weight to the contention that assessments should be performed at least once a month. (Personal observations)

REFERENCES

1. Sáez-Alquezar A, Consideraciones sobre el tamizaje serológico en donantes de sangre. Boletín electrónico del grupo cooperativo iberoamericano de medicina transfusional (GCIAMT), septiembre de 2010. gciamtboletin.blogspot.com.
2. BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 153 de 14 de Junio de 2004. Diário Oficial da União. Brasília.
3. Panamerican Health Organization. Manual of quality control procedures for serology laboratorios of the blood banks. Washington, technical document PAHO/HPC/HCT 94.21,1994.
4. World Health Organization. Control of Chagas disease. Geneva; WHO Technical Report Series 905. World health Organization, Geneva, 2002.
5. Duran MB & Guzmán MA. Evaluación externa de los resultados serológicos en los bancos de sangre de Colombia. Rev Panam Salud Publica. 2003 13(2/3): 138-143.
6. Grijalva MJ, Chiriboga RF, Vanhassel H, Arcos-Teran L. Improving the safety of the blood supply in Ecuador through external performance evaluation of serological screening of blood donors. J Clin Virol. 2005; 34 Suppl, 2. S47-S52.
7. Oknaian S, Remesar M, Ferraro I, del Pozo AE. External performance evaluation of screening in blood Banks in Argentina: results and strategies for improvement. Rev Panam Salud Publica. 2003; 13: 149-153.
8. Sáez-Alqu ezar, A.; Murta, M.; Marques, WP. Resultados de un Programa de Control de Calidad Externo del Tamizaje Serológico de Anticuerpos Contra Trypanosoma Cruzi en Donantes de Sangre en Brasil [The Results of an External Quality Control Program for Serological Screening for Antibodies to Trypanosoma Cruzi In Blood Donors In Brazil] Pan american Journal of Public Health 82, Vol. 13 (2/3) 129 – 137, 2003. [PMID: 12816129].
9. Sáez-Alqu ezar, A.; Otani, MM.; Sabino, EC.; Ribeiro dos Santos, G.; Salles, NA.; Chamone, DAF. Evaluation of the Performance of Brazilian Blood Banks in Testing for Chagas Disease. Vox Sanguinis, Vol. 74 (4): 228 – 231, 1998. [PMID: 9691403].
10. Sáez-Alqu ezar, A.; Otani, MM.; Sabino, EC.; Salles, NA.; Chamone, DAF. Programas de Control Externo de la Calidad en Serologia desarrollados en América Latina con el apoyo de la OPS entre 1997 y 2000 [External Serology Quality Control Programs developed with the Support of PAHO from 1997 through 2000]. Pan American Journal of Public Health 82, Vol. 13 (2/3) 91 – 102, 2003. [PMID: 12751462].
11. Sáez-Alquezar A, Control de calidad en serología para bancos de sangre en América Latina. Revista Uruguaya de Patologia Clínica, vol 40: 3-10, 2006.
12. Westgard J, Mercapide L, Sáez-Alquezar A, Porras A, Martinez O, Amaya E, Iturriza M, Mendoza E, Brambila E & Terrés A. Como garantizar La calidad Analítica. Rev Mex Patol Clin, vol 57(4) PP 179-189; Octubre 2010.
13. Grubb's test for detecting outliers. Disponible en: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/GrubbsHowTo.cfm>.
14. Levey S and Jennings ER. The use of control charts in clinical laboratories. Am J Clin Pathol; 20:1059-1066, 1950
15. Multirule and —Westgard Rules. Disponible en: <http://www.westgard.com/multirule>.

Control de calidad en el tamizaje para enfermedades infecciosas en bancos de sangre. ¿Por qué? y ¿cómo?

Amadeo Sáez-Alquezar¹, Pedro Albajar-Viñas², André Valpassos Guimarães¹, José Abol Corrêa¹

¹ Programa Nacional de Controle de Qualidade (PNCQ)/Sociedade Brasileira de Análises Clínicas (SBAC), Rio de Janeiro, Brazil

² Organización Mundial de La Salud

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

Dr. Amadeo Sáez-Alquezar
Programa Nacional de Controle
de Qualidade (PNCQ)/Sociedade
Brasileira de Análises Clínicas (SBAC)
Rio de Janeiro, Brazil
Correo electrónico: amadeo62@gmail.com

Palabras clave:

control de calidad interno, control de calidad externo, enfermedades infecciosas, tamizaje, bancos de sangre, pruebas cualitativas

RESÚMEN

Procedimientos de control de calidad son indispensables para asegurar la confiabilidad de los resultados emitidos por los laboratorios responsables por el tamizaje serológico en bancos de sangre. Dentro de un sistema de gestión de la calidad las recomendaciones internacionales categoriza como de fundamental importancia de la adopción por lo menos de dos tipos de control: a) Control de calidad interno (CCI) y b) Control de calidad externo (CCE). En el CCE se considera que la participación en programas de evaluación externa debe tener una frecuencia mínima de evaluación mensual por el laboratorio. Por otro lado el CCI debe constituirse del uso diario de sueros control de baja reactividad (SCI) que deben ser introducidos sistemáticamente en todas las corridas, procesadas en el laboratorio para cada parámetro. Los criterios de aceptación y rechazo de las corridas, por medio del análisis del comportamiento de los SCI, podrá presentar algunas variaciones, pero lo realmente importante es que esos criterios sean definidos previamente y todavía más importante que sean obedecidos; y eso corresponde a la validación de las corridas analíticas de cada prueba. Esta ha sido, por ejemplo, la experiencia del PNCQ*,

el cual desde 2010 ha desarrollado programas de control de calidad externo en serología para bancos de sangre usando muestras de suero liofilizadas y bien caracterizadas para la reactividad referente a los parámetros usados en el tamizaje serológico de donantes de sangre. Esos programas han utilizado paneles ciegos de seis muestras para evaluaciones mensuales. En las últimas 50 evaluaciones, con la participación de 68 bancos de sangre en Brasil, se observó un número importante de no conformidades en todas las evaluaciones mensuales. Estos resultados sirven de apoyo a la recomendación de que las evaluaciones sistemáticas deben ser por lo mínimo mensuales.

(*): *Programa Nacional de Controle de Qualidade*

INTRODUCCIÓN

El escenario actual del tamizaje serológico para enfermedades infecciosas en bancos de sangre incluye el uso de pruebas serológicas cualitativas para HIV, HTLV, HCV, HBV y sífilis. En los países de América Latina, endémicos para la enfermedad de Chagas, también se realiza el tamizaje para anti-*T.cruzi*. Paralelamente al tamizaje serológico se recomienda el uso de pruebas NAT (nucleic acid testing) para HIV, HBV y HCV para disminuir el riesgo de transmisión durante el periodo de ventana inmunológica.

El tamizaje serológico se realiza utilizando pruebas sensibles y específicas, con metodologías ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) y CLIA (chemiluminescence immunoassay) en la mayoría de los casos en plataformas automatizadas para atender al gran volumen de muestras y al tiempo corto para la soltura de los resultados¹.

Todas las pruebas serológicas usadas en el tamizaje son cualitativas y deben ser acompañadas por procedimientos de control de calidad adecuados para ese tipo de pruebas y que aseguren la calidad de los resultados finales.

Procedimientos de control de calidad son indispensables para asegurar la calidad de los resultados emitidos por los laboratorios responsables por el tamizaje serológico. Recomendaciones internacionales y nacionales indican que dentro de un sistema de gestión de la calidad es de fundamental importancia que se adopten por lo menos dos tipos de control: a) Control de calidad interno y b) Control de calidad externo¹⁻⁴.

El control de calidad externo significa la participación en por lo menos un programa de evaluación externa de la calidad (PEEC) que use paneles bien caracterizados que contengan muestras para todos los parámetros del tamizaje y que además permitan tener una evaluación como mínimo mensual.

Desde el final de los años 90, por iniciativa de la Organización Panamericana de la Salud (OPS) los laboratorios de referencia de bancos de sangre de la mayoría de los países de América Latina pasaron a participar en programas de control de calidad en serología y muchos de ellos pasaron a funcionar como centros organizadores en el desarrollo interno de cada país de esos mismos programas⁵⁻¹¹. Hasta los días de hoy se mantiene esa tradición de participar de los programas de evaluación externa (PEED), principalmente debido a las solicitudes contenidas en las normativas de los países y por recomendación de entidades internacionales. *No todos los programas tienen las mismas características y en general no atienden a la necesidad de evaluaciones mensuales.*

Ya con respecto a la adopción del control de calidad interno, por el uso de sueros control de baja reactividad, aunque las normativas nacionales recomienden su uso, quedan poco visibles los resultados obtenidos y parece existir poca uniformidad en los procedimientos y reglas a ser adoptados.

El objetivo de este trabajo (manuscrito) es presentar los procedimientos más adecuados para

el desarrollo de los programas de control de calidad externo y para la implementación del control de calidad interno, siempre pensando en pruebas serológicas cualitativas usadas en el tamizaje de donantes de sangre.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

De acuerdo con el Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI) la ronda analítica es el intervalo de tiempo en que se llevan a cabo una serie de mediciones de manera estable en términos de precisión y exactitud pero hemos de llevar en consideración que pueden ocurrir efectos adversos que deberán ser detectados de forma adecuada¹². El Control de calidad interno corresponde al uso diario de sueros control de baja reactividad que deben ser introducidos en todas las corridas (rondas), efectuadas en el laboratorio para cada parámetro.

Hemos de considerar que la validación del programa de control interno es responsabilidad de cada laboratorio, de forma que pueda atender a las necesidades básicas dentro de sus características de funcionamiento. Al mismo tiempo es importante considerar la importancia de la armonización de los criterios de uso y de

aceptación en la práctica diaria de los sueros control interno de baja reactividad (SCI).

Ha de quedar bien claro que los SCI son diferentes de los sueros control positivos o negativos que hacen parte de los kits diagnósticos. Los SCI pueden ser preparados en los propios laboratorios o, lo más recomendable, que sean adquiridos de proveedores especializados en la producción de esos productos.

Los SCI deben ser usados diariamente en la rutina del laboratorio para monitorear el comportamiento de cada prueba. Sirven para validar las corridas analíticas. El número, la frecuencia y los niveles de los controles dependerán del número y de la magnitud de la ronda analítica. En las pruebas ELISA, que usan micro placas, se utiliza un SCI positivo y un negativo para cada micro placa de la rutina. Para los equipos de flujo continuo se recomienda el uso de un SCI positivo por cada 100 o 200 muestras.

Inicialmente cada SCI debe ser ajustado para el uso con cada prueba específica. En la mayoría de los laboratorios en América Latina se han adoptado los criterios de reactividad mostrados en el Cuadro 1¹.

Cuadro 1 Sueros Control Interno (SCI) de baja reactividad para monitorear las rondas diarias en los laboratorios que realizan el tamizaje serológico de donantes de sangre

SCI Positivos	
Índice: valor de lectura / valor de corte	>1.0
Rango recomendado	2.0 – 4.5
Para pruebas competitivas, índice	>1.0
Rango recomendado	0.3 – 0.7
SCI Negativos	
Índice: valor de lectura / valor de corte	>1.0
Rango recomendado	<0.8
Para pruebas competitivas	>2.0

Cuando los SCI son preparados internamente, se han de hacer ajustes (diluciones) para alcanzar el índice de reactividad dentro del rango establecido. Cuando se compran de proveedores, aunque la mayoría prepare esos sueros individualmente para cada una de las marcas comerciales, no siempre encontraremos los valores adecuados y frecuentemente tendremos que hacer ajustes por dilución para alcanzar los valores deseados. Claro que eso será posible únicamente cuando los valores de reactividad estén hacia arriba de los límites del rango deseado.

Después que se obtienen los valores de reactividad dentro del rango deseado, se recomienda que los SCI se almacenen a -20° C en alícuotas de volumen pequeño para uso diario. De esa manera se evita que ocurra decaimiento de la reactividad, como ocurre cuando alícuotas más grandes son almacenadas en refrigeración por periodos de varios días. Para cada uno de los SCI positivos escogidos para cada parámetro y para cada metodología, se realiza una estandarización efectuando veinte ensayos replicados para obtener la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación. La transformación de estos datos en unidades de desviación estándar (Z score) permite en primer lugar, excluir valores extremos (outliers) en las 20 determinaciones aplicando el test de Grubbs¹³ y al mismo tiempo facilita la construcción del gráfico de Levey Jennings¹⁴ que será usado para la inserción de los valores diarios de los SCI.

El gráfico de Levey Jennings sirve para reportar los valores sucesivos de control y permite un análisis diario del comportamiento de los SCI dentro de los límites de decisión: ± 1 DS, ± 2 DS y ± 3 DS. Por ese análisis se pueden evidenciar desvíos de la normalidad representados por tendencias (errores sistemáticos) o por dispersión de los resultados (errores aleatorios) y también por cambios repentinos que pueden

indicar cambio de lotes de reactivos o cambios importantes en los equipos.

La mejor manera de analizar las variaciones diarias de los SCI es utilizando algunas de las reglas de Westgard¹⁵. Por lo menos tres reglas consideradas de alerta (12DE, 22DE y 41DE) nos permiten identificar tendencias que pueden ser corregidas con antelación. Otras dos reglas consideradas mandatorias (1_{3DE} y 10x) nos indican que la corrida presento alteraciones importantes que ponen en riesgo los resultados obtenidos; de tal forma que no se deberán aceptar los resultados.

Además de los SCI positivos se deben utilizar SCI negativos. Los criterios de aceptación de reactividad de esos controles están en el Cuadro 1, y los procedimientos para estandarización y aplicación en el gráfico de Levey Jennings son los mismos que para los SCI positivos, con la única diferencia que en este caso, para el análisis del comportamiento diario, no se utilizan las reglas de Westgard. Importa únicamente verificar la uniformidad de los resultados, siempre negativos, alrededor de la media.

Como fue comentado anteriormente la validación del programa de control interno es responsabilidad de cada laboratorio, de forma que pueda atender a las necesidades básicas dentro de sus características de funcionamiento. Los criterios de aceptación y rechazo de las corridas, por medio del análisis del comportamiento de los SCI, podrá presentar algunas variaciones, pero lo más importante es que esos criterios sean definidos y todavía más importante que sean obedecidos. *Eso corresponde a la validación de las corridas analíticas de cada prueba.*

En la práctica diaria es bastante común que ocurran variaciones entre los distintos lotes de una misma prueba del mismo fabricante. Si esas variaciones son muy significativas podrán afectar directamente los resultados de las muestras analizadas, por lo que, las normas de algunos

países recomiendan que en el cambio de lotes de los kits de diagnóstico, el laboratorio haga una evaluación para garantizar la continuidad del desempeño del lote anterior³. Variaciones menos significativas se observan casi siempre en el cambio de lotes y ha de quedar bien claro que cuando ocurre este cambio, hace falta estandarizar nuevamente el SCI positivo que estaba siendo utilizado.

El uso de paneles de suero para poder evaluar los kits de diagnóstico antes de la utilización en la rutina, bien como en los cambios de lotes, para verificar si se mantiene el desempeño inicial: *Validación de lotes de kits antes de usarlos y validación lote a lote*².

En el Cuadro 2 están las recomendaciones finales para el uso del Control de calidad interno.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO O PROGRAMAS DE EVALUACIÓN EXTERNA DE LA CALIDAD (PEEC)

Corresponde a una evaluación externa del desempeño de los laboratorios a modo de permitir que el procedimiento sirva para verificar

la calidad de los resultados generados por un laboratorio.

En general, los PEEC son desarrollados por instituciones consideradas de referencia o por proveedores de productos específicos para la calidad, que pasan a ser considerados como el Centro Organizador (CO). La participación en los PEEC puede ser voluntaria u obligatoria. Cuando la participación es voluntaria significa que existe una responsabilidad profesional individual de forma que los responsables por los laboratorios participantes están interesados en conocer y mejorar su desempeño. El inconveniente es que solamente los laboratorios que están preocupados por su desempeño son evaluados. Cuando la participación es obligatoria, los datos obtenidos en cada programa son más reales porque la evaluación engloba a todos los laboratorios de la red (estado, país.). De cualquier manera el hecho de que la participación sea obligatoria no garantiza el aprovechamiento de los resultados o la mejoría de los servicios porque no todos los participantes van a aprovechar las informaciones generadas en cada programa^{1,14}.

Cuadro 2 Recomendaciones a respecto del Control de calidad interno para uso en los laboratorios que realizan el tamizaje serológico de donantes de sangre

Los SCI positivos deberán ser ajustados para cada prueba, dentro de los criterios establecidos de reactividad (Cuadro 1)

Es fundamental que los SCI se apliquen en todas las corridas analíticas y que se haga el análisis de los resultados insertados en el gráfico de Levei Jennings, diariamente

Es necesario establecer criterios mínimos de aceptación y que se usen para validar las corridas diarias

En el cambio de lotes de los kits diagnósticos utilizados es necesario que se repita la estandarización de los SCI positivos

Siempre que sea posible también se recomienda que los nuevos lotes de kits diagnósticos sean evaluados utilizando paneles de sueros con muestras reactivas y no reactivas, bien caracterizadas. (evaluación lote a lote)

Las herramientas de trabajo de los PEEC son paneles ciegos de muestras de suero que el centro organizador envía a todos los laboratorios participantes (LP). Esas muestras deben estar muy bien caracterizadas por distintas pruebas comerciales para cada parámetro y las muestras reactivas deben ser confirmadas por pruebas suplementarias. Es imposible que las muestras sean caracterizadas para todas las pruebas que existen en el mercado para el ensayo de cada parámetro, pero se recomienda que se usen aquellas de uso más frecuente en la región, contemplando las metodologías más usadas actualmente que son ELISA y CLIA.

Tratándose del PEEC para evaluar el desempeño del tamizaje de bancos de sangre, es mejor que los paneles ciegos usados contengan muestras con reactividad variable para todos los parámetros del tamizaje y así tendríamos una reproducción exacta de las condiciones de rutina del tamizaje. También existe la posibilidad de usar paneles de sueros ciegos para únicamente un parámetro, como ocurre muy frecuentemente con respecto al tamizaje para anti-*T.cruzi* en países no endémicos para la enfermedad de Chagas.

La mejor manera de obtener las muestras de los paneles es a través de bolsas de plasma que fueron descartadas por haber presentado reactividad para alguno de los parámetros del tamizaje serológico. Esas unidades de plasma se transforman en suero por medio de un proceso de recalcificación y posterior diálisis o filtración. Cada unidad de suero deberá ser caracterizado antes de la preparación de los paneles.

En ciertas situaciones será necesario hacer diluciones para obtener la cantidad de muestra necesaria para el desarrollo de los programas, pues en verdad todos los LP deben recibir las mismas muestras para que el análisis y la comparación entre los resultados finales sean adecuados. Para cada parámetro existe un límite

de dilución para que las muestras mantengan sus características de reactividad para todas las pruebas de tamizaje y para las pruebas suplementarias usadas para confirmar la positividad.

El CO de un PEEC es responsable por la logística de preparar y enviar los paneles a todos los LP, que deberán procesar las muestras como si fuesen de la rutina normal. La idea es evaluar el desempeño de los LP dentro de un clima de cooperación y manteniendo la más estricta confidencialidad sobre los resultados individuales.

Como las pruebas serológicas usadas en el tamizaje son cualitativas, posibles fallas en los procedimientos internos de los laboratorios podrán dar origen a dos tipos de no conformidades: a) Resultados Falsos Reactivos (RFR) o b) Resultados Falsos no Reactivos (RFNR).

El CO debe evaluar el desempeño de los LP y preparar dos tipos de documentos: a) una evaluación individual para cada LP (confidencial) y b) un informe final donde consten informaciones estratégicas como la caracterización de las muestras del panel, porcentaje de RFR y RFNR generados en el programa, con cada una de las pruebas o metodologías adoptadas por los LP y el número total de LP. Estos datos no deben ser confidenciales y podrán estar abiertos para todos los LP y también para los responsables de la distribución de kits de diagnóstico y para las autoridades competentes del área de salud interesadas en el tema. El aprovechamiento es mucho mejor cuando se analizan y se discuten internamente los resultados de las evaluaciones y de los informes finales. Todas las NO-conformidades observadas (RFR y/o RFNR) deben ser documentadas y discutidas para poder encontrar las posibles causas que pudieron originarlas. En el Cuadro 3, se pueden observar los principales errores observados en el desarrollo de los PEEC.

Las recomendaciones finales para el mejor aprovechamiento de la implementación del

Cuadro 3 Problemas detectados más frecuentemente en el desarrollo de PEEC con los laboratorios de tamizaje serológico de bancos de sangre

Problema	Fase
Contaminación de las muestras	Pre-analítica/ Analítica
Errores en la transcripción de los resultados	Analítica/ Post-analítica
Fallas de sensibilidad o especificidad de los kits usados	Pre-analítica/ Analítica
Procedimientos inadecuados de control de calidad interno	Analítica
Conservación inadecuada de las muestras	Analítica/ Pre-analítica

control de calidad interno y de la participación en los programas de evaluación externa se presentan en el Cuadro 4.

En el escenario actual del control de calidad de los laboratorios se considera indispensable que las evaluaciones de los PEEC tengan una frecuencia, como mínimo mensual. Estudios recientes muestran que PEEC realizados en laboratorios de serología para el tamizaje de enfermedades infecciosas en bancos de sangre reportan no-conformidades (RFR y/o RFNR) en

prácticamente todos los meses en que hubo evaluación.

El “Programa Nacional de Controle de Qualidade” (PNCQ) es el mayor proveedor de ensayos de aptitud y de sueros control interno en el Brasil. Desde 2010, el PNCQ desarrolla programas de control de calidad externo en serología para bancos de sangre usando muestras de suero liofilizadas y muy bien caracterizadas para la reactividad referente a los parámetros usados en el tamizaje serológico de donantes de sangre.

Cuadro 4 Consideraciones sobre los procedimientos de control de calidad a ser adoptados en los laboratorios de Tamizaje serológico de donantes de sangre

Participación en por lo menos un PEEC con evaluaciones mensuales

Uso diario de SCI (+) y (-) para monitorear y validar las corridas analíticas

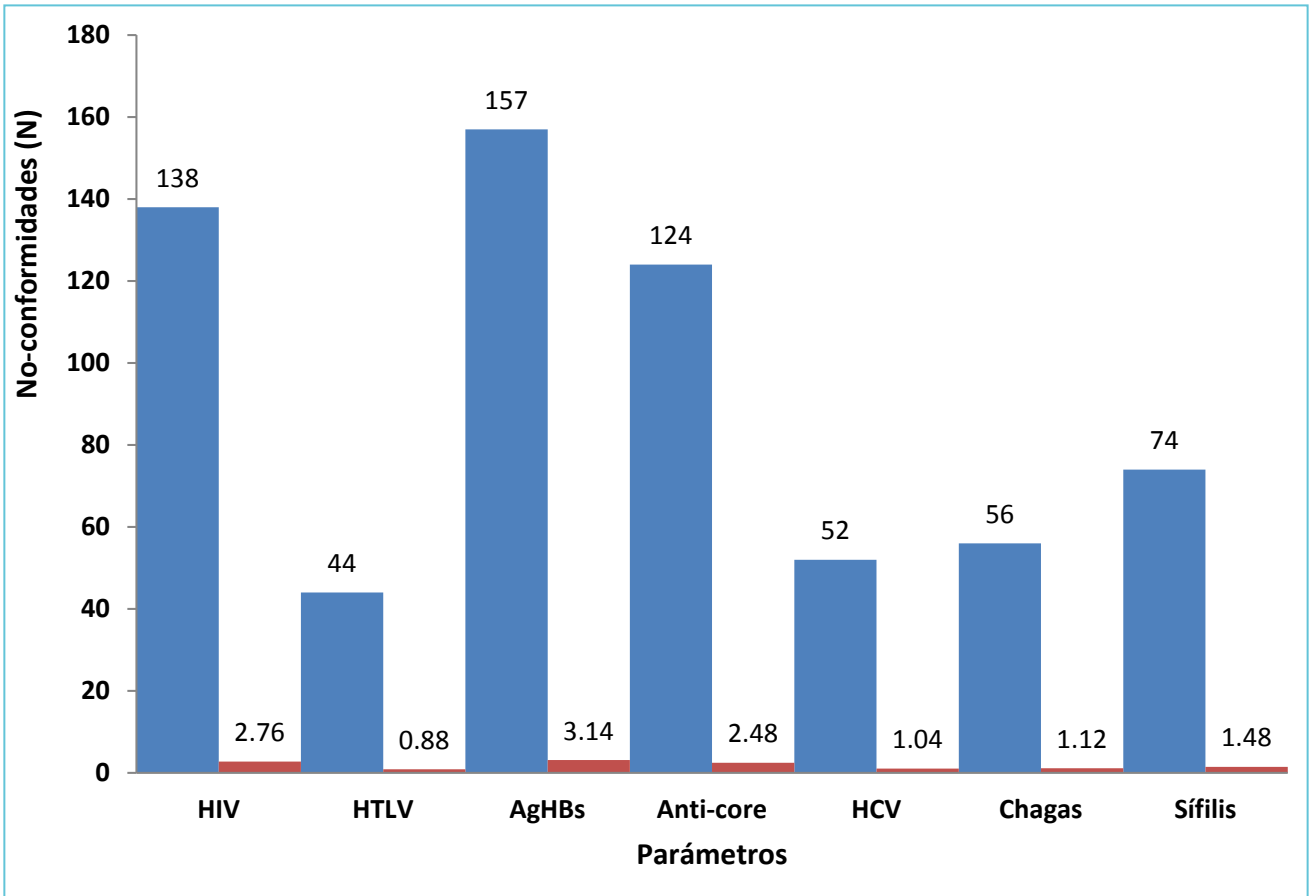
Educación y capacitación continua del personal técnico del laboratorio

Uso de kits diagnósticos de calidad comprobada (evaluación antes del uso)

Aseguramiento de la calidad interna de los equipamientos, procedimientos, reactivos diagnósticos y registros completos de todas las actividades

Visitas periódicas de inspección que hagan cumplir las normas oficiales

Figura 1 Número total de No-conformidades en la evaluación mensual de 50 PEED (en azul) y el promedio de No-conformidades por programa (en rojo)



Esos programas utilizan paneles ciegos de seis muestras para evaluaciones mensuales.

En los últimos 50 programas, con la participación de 68 bancos de sangre en Brasil, se observó un número importante de no conformidades (RFR y/o RFNR) en todas las evaluaciones mensuales (Figura 1), lo que refuerza la importancia del concepto de que las evaluaciones deben ser por lo mínimo mensuales. (Observaciones personales).

BIBLIOGRAFÍA

1. Sáez-Alquezar A, Consideraciones sobre el tamizaje serológico en donantes de sangre. Boletín electrónico del grupo cooperativo iberoamericano de medicina transfusional (GCIAMT), septiembre de 2010. gciamtboletin.blogspot.com.

2. BRASIL. Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução da Diretoria Colegiada- RDC nº 153 de 14 de Junio de 2004. Diário Oficial da União. Brasília.

3. Panamerican Health Organization. Manual of quality control procedures for serology laboratories of the blood banks. Washington, technical document PAHO/HPC/HCT 94.21,1994.

4. World Health Organization. Control of Chagas disease. Geneva; WHO Technical Report Series 905. World health Organization, Geneva, 2002.

5. Duran MB & Guzmán MA. Evaluación externa de los resultados serológicos en los bancos de sangre de Colombia. Rev Panam Salud Publica. 2003 13(2/3): 138-143.

6. Grijalva MJ, Chiriboga RF, Vanhassel H, Arcos-Teran L. Improving the safety of the blood supply in Ecuador through external performance evaluation of serological screening of blood donors. J Clin Virol. 2005; 34 Suppl, 2. S47-S52.

7. Oknaian S, Remesar M, Ferraro I, del Pozo AE. External performance evaluation of screening in blood Banks in Argentina: results and strategies for improvement. *Rev Panam Salud Publica*. 2003; 13: 149-153.
8. Sáez-Alqu ezar, A.; Murta, M.; Marques, WP. Resultados de un Programa de Control de Calidad Externo del Tamizaje Serológico de Anticuerpos Contra Trypanosoma Cruzi en Donantes de Sangre en Brasil [The Results of an External Quality Control Program for Serological Screening for Antibodies to Trypanosoma Cruzi In Blood Donors In Brazil] *Pan american Journal of Public Health* 82, Vol. 13 (2/3) 129 – 137, 2003. [PMID: 12816129].
9. Sáez-Alqu ezar, A.; Otani, MM.; Sabino, EC.; Ribeiro dos Santos, G.; Salles, NA.; Chamone, DAF. Evaluation of the Performance of Brazilian Blood Banks in Testing for Chagas Disease. *Vox Sanguinis*, Vol. 74 (4): 228 – 231, 1998. [PMID: 9691403].
10. Sáez-Alqu ezar, A.; Otani, MM.; Sabino, EC.; Salles, NA.; Chamone, DAF. Programas de Control Externo de la Calidad en Serologia desarrollados en América Latina con el apoyo de la OPS entre 1997 y 2000 [External Serology Quality Control Programs developed with the Support of PAHO from 1997 through 2000]. *Pan American Journal of Public Health* 82, Vol. 13 (2/3) 91 – 102, 2003. [PMID: 12751462].
11. Sáez-Alquezar A, Control de calidad en serología para bancos de sangre en América Latina. *Revista Uruguaya de Patologia Clínica*, vol 40: 3-10, 2006.
12. Westgard J, Mercapide L, Sáez-Alquezar A, Porras A, Martinez O, Amaya E, Iturriza M, Mendoza E, Brambila E & Terrés A. Como garantizar La calidad Analítica. *Rev Mex Patol Clin*, vol 57(4) PP 179-189; Octubre 2010.
13. Grubb’s test for detecting outliers. Disponible en: <http://www.graphpad.com/quickcalcs/GrubbsHowTo.cfm>.
14. Levey S and Jennings ER. The use of control charts in clinical laboratories. *Am J Clin Pathol*; 20:1059-1066, 1950.
15. Multirule and —Westgard Rules. Disponible en: <http://www.westgard.com/multirule>.

Recent advances in the laboratory diagnosis of tuberculosis

Rommy Teran¹, Jacobus H. de Waard²

¹ *Laboratory of Microbiology, Faculty of Chemistry, Central University of Ecuador*

² *Prometheus Program, Faculty of Chemistry, Central University of Ecuador*

ARTICLE INFO

Corresponding authors:

Dr. Rommy Teran
Dr. Jacobus H. de Waard
Faculty of Chemistry
Central University of Ecuador
E-mails: riteran@uce.edu.ec,
jacobusdeward@gmail.com

Key words:

tuberculosis, molecular diagnosis,
Drug Sensitivity Testing (DST),
NAAT, LAMP, Xpert MTB/RIF

Acknowledgments:

The Prometheus Project of the Ministry of Higher Education, Science, Technology and Innovation of the Republic of Ecuador sponsored this work.

ABSTRACT

The laboratory plays a decisive role in diagnosing tuberculosis (TB) and the identification and drug sensitivity testing (DST) of *Mycobacterium tuberculosis*. For a long time the laboratories used only microscopy- and culture-based diagnosis, however, due to the slow growth of mycobacteria, these procedures may require 3-4 weeks or longer to yield results. It has been necessary to look for new and rapid diagnostic methods. In the beginning of the 90s, molecular-based diagnosis has become available providing rapid detection, identification and DST of *M. tuberculosis*. The present article will review some of the new methodology that has been introduced in the clinical laboratory. We discuss the LED microscope and PCR-based techniques for the diagnosis of TB, immunological assays for the diagnosis of active TB and latent infection, PCR-based methods and hybridization assays for the identification of mycobacteria and liquid culture methods and line probe assays for fast DST. Although these new techniques are useful for a rapid result, we emphasize that culture-based diagnosis is still the gold standard for the diagnosis and follow up on TB. The newer molecular methods cannot replace

the conventional diagnostic methods but provide preliminary information and improve patient management.

INTRODUCTION

Tuberculosis (TB) is one of the leading infectious diseases in the world and is responsible for more than 2 million deaths and 8 million new cases annually. The disease is caused by a bacterium called *Mycobacterium tuberculosis*. The bacteria usually attack the lungs, but can infect any part of the body such as the kidney, intestine, pleura, spine, and brain. If not treated properly, this infectious disease can be fatal.

The most important control strategy for TB is the early detection and the appropriate treatment of infectious cases. However, globally the case detection rate (CDR) of TB has been estimated in only 64%, which means that about 36% of the incident TB cases are not detected. This leaves a gap of approximately 3.3 million people worldwide with TB who were “missed”, either because they were not diagnosed or because they were diagnosed but not reported (1). For the Americas, the CDR is about 79%, which means that yearly about 33,000 TB patients on our continent are not detected or reported (1).

The laboratories play a central role in TB diagnosis and therefore the strengthening of the laboratory capacity and performance is a priority for TB control. In the majority of the laboratories TB is diagnosed only by smear microscopy. Smear microscopy has suboptimal sensitivity and detects only about 60-70% of the TB cases. In addition, about 25% of all TB cases are extra pulmonary TB and the diagnosis of this presentation of TB is often missed with smear microscopy. The implementation of culture for the diagnosis can improve the TB detection rate of a laboratory by about 30-40%. Culture detects cases with low mycobacterial loads and is needed in cases at risk of drug-resistant TB for drug resistance

testing (DST), or in cases where disease due to another member of the *Mycobacterium* genus is suspected. These two laboratory methods, smear microscopy and culture are still the “gold standards” for the diagnosis of TB and culture is considered as the most sensitive method. Yet, due to the slow growth of mycobacteria, results can take 3-4 weeks or longer and faster and more sensitive diagnostic tests are required to improve patient management.

Since the beginning of the 90s, new laboratory techniques for the diagnosis of TB and DS testing have been developed based on the use of liquid culture medium, nucleic acid amplification techniques (NAATs), DNA hybridization and mutation detection techniques, and antibody and antigen detection. This review is designed to offer some general information about new laboratory technique currently available for the diagnosis of active TB or the detection of latent TB infection. This review is not all-encompassing and will only deal with the most important technical developments. Method comparison is not within the scope of this article and interested readers are referred to the more specialized literature.

IMPROVEMENTS IN SMEAR MICROSCOPY FOR THE DIAGNOSIS OF TB

Microscopic examination of sputum specimens has been the basis of TB case detection for over 100 years and still, in resource-limited settings, the diagnosis of TB relies on Ziehl-Neelsen smear microscopy with the light microscope. Smear microscopy with the light microscope is a relatively insensitive methodology for the diagnosis of TB and only detects about 60-70% of the TB cases. An alternative for the light microscope is the fluorescence microscope, reported to be 10% more sensitive, since the fluorescent bacilli of *M. tuberculosis* can be seen at lower magnification and the smears can be examined

in only 25% of the time taken to read with the light microscope. However, it has been difficult to implement microscope in the diagnosis of TB due to the higher cost associated with purchase of the microscope with a mercury vapor lamp, the need for frequent replacement of the this UV lamp, which lasts only 200–300 h, and the need for a dark room for reading the slides (2).

Recent technical developments of a fluorescence microscope, which uses an illumination system based on a light-emitting diode (LED) with a long life-span of ten thousands of hours, resulted in the LED fluorescence microscopy. Based on LEDs relatively inexpensive fluorescent microscopes are now available. The World Health Organization (WHO) has assessed the efficacy of LED microscopy, and the results showed that diagnosis with this microscope was more sensitive (about 10%) than conventional smear microscopy (2, 3). Based on these findings, WHO recommends that conventional and the fluorescence microscopy will be replaced by LED microscopy.

ALTERNATIVE CULTURE-BASED METHODS FOR THE DIAGNOSIS OF TB

The gold standard test for the diagnosis of TB is the isolation of *M. tuberculosis* on a culture medium. Culture in addition provides isolates for identification (based on biochemical tests or molecular methods) and DST. Until the early nineties culturing was usually done on solid egg-based media like Lowenstein Jensen and Stonebrink medium. A drawback of culturing on these solid media is the slow growth of the bacterium; it can take at least 2 to 4 weeks or even longer before a culture becomes positive.

Liquid medium have an increased sensitivity for the growth of *M. tuberculosis* (up to 20% increase in positivity) and a reduced delay in the detection (10-14 days versus 2-4 weeks). A drawback is the contamination rate of liquid

medium, which seems to be higher in comparison with the solid media (4). WHO now recommends the use of traditional solid media along with liquid media in primary isolation of mycobacteria.

Concerning liquid medium, home-based liquid broth culture can be used for this purpose containing Middlebrook 7H9 broth supplemented with 10% OADC (oleic acid, albumin, dextrose, and catalase) and, to overcome contamination with other microorganisms, PANTA (an antibiotic mixture of polymyxin, amphotericin B, nalidixic acid, trimethoprim, and azlocillin). At present, also a number of elaborate culture systems are available commercially. They range from simple bottles and tubes such as MGIT (BD Diagnostic Systems, USA), Septi-Chek AFB (BD, USA) and MB Redox (Biotest Diagnostics, USA) to semiautomated system (BACTEC 460TB) and fully automated systems (BACTEC 9000 MB and BACTEC MGIT 960) (all BD, USA), ESP Culture System II (Trek Diagnostics, USA) and MB/BacT ALERT 3D System (BioMérieux, NC). For comparison studies of these (semi) automatic systems, the reader is referred to the specialized literature (5, 6, 7).

DNA BASED TOOLS FOR THE DIAGNOSIS OF TB

Classic Nucleic Acid Amplification tests (NAATs)

Since the early 1990, several methodologies have been published for the detection of *M. tuberculosis* with the polymerase chain reaction (PCR) assay, using oligonucleotide primers to amplify a DNA fragment specific for this microorganism. These NAATs can give results in 3–6 hours. Tests include commercial kits and those that are “in-house” and based on a protocol developed in a non-commercial laboratory. Each NAAT uses a different method to amplify specific nucleic-acid regions in the *Mycobacterium tuberculosis* complex.

Several commercial NAATs exist and the U.S. Food and Drug Administration (FDA) has approved the use of select commercial NAATs for respiratory specimens only. These kits include: the GenProbe Amplified *M. tuberculosis* Direct test (AMTD), the Roche Amplicor MTB test, the Cobas Amplicor test, the Abbott LCx test, and the BD-ProbeTec (SDA) test (8). None of these methods has been approved for direct detection of *M. tuberculosis* from extrapulmonary specimens. Although all of these current technologies are rapid and have demonstrated excellent specificity, their performance characteristics can vary and their sensitivity still does not equal that of culture-based methods, especially for smear-negative samples. A recent meta-analysis on the accuracy of commercial NAATs, which examined over 125 studies looking at smear-positive samples, showed a high degree of variability in accuracy across the studies (9). This analysis concludes that there is a need for improvement in diagnostic accuracy of NAATs, particularly sensitivity and commercial NAATs alone cannot be recommended to replace culture and microscopy for diagnosing pulmonary TB (8, 9).

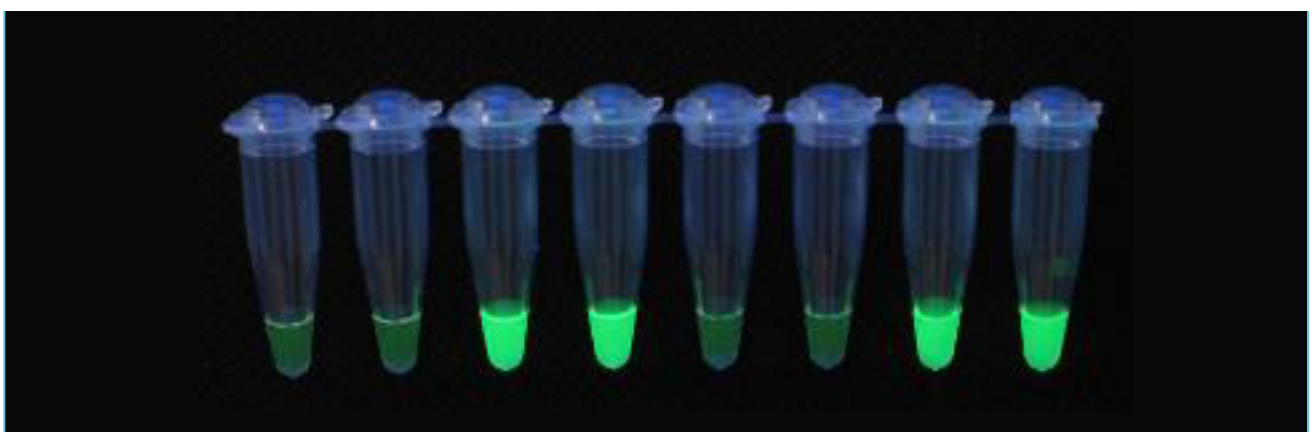
The Loop-mediated Isothermal Amplification test (LAMP)

Another commercial NAAT, which has been developed recently, is the Loop-mediated Isothermal Amplification (LAMP) test. Research experience is limited with this test. The method is based on the novel loop-mediated isothermal amplification (LAMP) platform from Eiken Chemical Co. in Japan. This technology amplifies target DNA under isothermal conditions (about 65°C) and is designed to visually detect DNA directly from clinical samples, in less than two hours and with minimal instrumentation. There is no need for a step to denature double stranded into a single stranded form. Amplification and detection of the DNA takes place in the same microfuge tube. See Figure 1.

The rather complex process of amplification is detailed at the Eiken website, which also includes an animation of the reaction (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>).

A WHO Expert Group agreed that LAMP technology has potential as a rapid TB diagnostic tool but that the evidence available on the TB-LAMP

Figure 1 LAMP technology as a rapid TB diagnostic tool



Positive LAMP reactions are shown in the two tubes on the right. Amplification and detection of DNA takes place in the same tube. The two tubes on the left are negative reactions. The image was taken under UV illumination and fluorescence is due to addition of PicoGreen to all tubes, a DNA binding dye, which will form a dye-DNA complex with the amplified product, which makes it easy to distinguish between positive and negative reaction. Adapted from: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/lamp_assay.html.

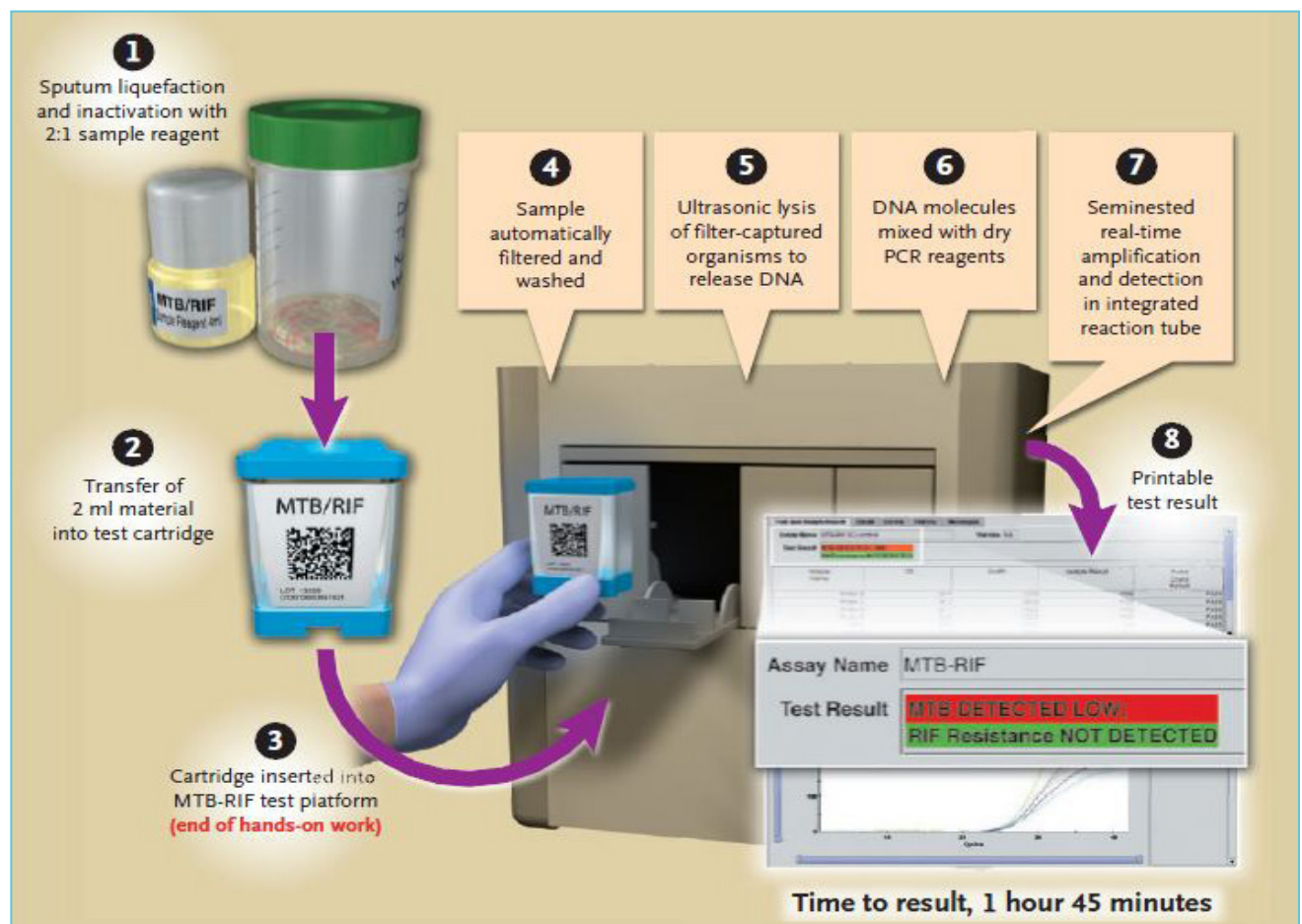
assay is insufficient to make a recommendation either in favour of, or against the use of TB-LAMP as a replacement test for sputum smear microscopy. Actually, at 14 sites, WHO is conducting independent studies to test the assay, assessing the feasibility and cost-effectiveness. Results of this study are expected in the year 2015 (10).

Xpert MTB/RIF nucleic acid amplification tests for diagnosis of drug resistant TB

The current NAAT methods, available for the detection of *M. tuberculosis* DNA, include sputum sample processing and DNA extraction as separated steps. Xpert MTB/RIF integrates sputum processing, the DNA extraction and the

amplification in a one-step sample preparation (see Figure 2). This automated cartridge-based assay detects, directly from sputum in under two hours, simultaneously *M. tuberculosis* complex and rifampicin resistance. The technology is based on the GeneXpert platform (11). The platform enables the detection of rifampicin resistance via the detection of mutations in the *rpoB* gene. The closed system ensures that there is no risk of contamination and no requirement for bio-safety facilities. A diagnostic test accuracy review including 27 unique studies concluded that, in comparison with smear microscopy, Xpert® MTB/RIF increased TB detection among culture-confirmed cases by 23%. For rifampicin resistance detection, the Xpert®

Figure 2 Assay procedure for the MTB/RIF test



From: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/automated_naat.html

MTB/RIF pooled sensitivity was 95% and pooled specificity was 98% (12). WHO recommended the use of Xpert® MTB/RIF in December 2010 and is now promoting the global roll-out of the technology. In order to facilitate access to this technology, the public sector in eligible countries can purchase test cartridges at significant price reductions. As of 31 December 2014, a total of nearly 4000 GeneXpert instruments and over 10 million MTB/RIF cartridges had been procured in the public sector of 116 of the 145 countries eligible for concessional pricing (13).

SERODIAGNOSIS OF TB

The detection of antibodies against *M. tuberculosis* in serum, serodiagnosis, could offer low-cost, rapid results. However, recent meta-analyses and systematic reviews concluded that currently available commercial serological tests provided inconsistent results (14) due to cross reactivity and poor sensitivity. The WHO currently recommends against their use for the diagnosis of pulmonary and extrapulmonary TB (15). Further research is needed to develop immune response-based or serodiagnostic tests with appropriate performance.

DIAGNOSIS OF LATENT *M. TUBERCULOSIS* INFECTION

Persons with latent TB infection are infected with *M. tuberculosis*, but do not have TB disease. About 30% of the world population is infected with *M. tuberculosis* and until recently this only could be detected with the tuberculin skin test (TST), also called a Mantoux test. The test is done by injecting intradermally a small amount of a purified protein derivative of *M. tuberculosis* (PPD) into the skin on the inner forearm. If ever been exposed to *M. tuberculosis*, an induration will develop at the injection site within 2 days.

The test does not differentiate between latent infection and active disease and its limitations, including poor sensitivity and specificity, have been well publicized. False-positive TSTs can result from contact with nontuberculous mycobacteria or vaccination with Bacille Calmette-Guerin (BCG), because PPD, a crude protein preparation, contains antigens that are also present in BCG and certain nontuberculous mycobacteria (16, 17). However, skin testing still remains the most widely used method to identify TB infection.

Recognition that interferon gamma (IFN- γ) plays a critical role in regulating cell-mediated immune responses to *M. tuberculosis* infection led to the development of alternative tests for the detection of TB infection; the IFN- γ -release assays (IGRAs). IGRAs are in vitro blood tests of cell-mediated immune response; they measure T cell release of interferon (IFN)-gamma following stimulation of a blood sample from a patient by TB-specific antigens, ESAT-6 and CFP-10, unique to *M. tuberculosis*. There are two commercially available IGRAs; Quantiferon TB Gold tests, Cellestis, Victoria, Australia and T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, Abington, UK. Several published studies have demonstrated a better performance of these tests over the TST in the diagnosis of a TB infection (18). Despite these studies, the lack of a reference standard test for LTBI makes it difficult to access the true accuracies of these assays. IGRAs cannot distinguish between latent infection and active tuberculosis (TB) disease and should not be used for diagnosis of active TB.

Mycobacterium species identification

The genus *Mycobacterium* comprises more than 150 species and several newly discovered pathogenic nontuberculous mycobacterial (NTM) species were described in the last 20 years. Although most TB cases worldwide are caused by *M. tuberculosis*, each of the closely

related members of the *M. tuberculosis* complex can cause tuberculosis in humans; for example *M. bovis* transmitted from cattle. The NTM species most frequently associated with pulmonary disease are *M. avium*, *M. kansasii* and *M. abscessus* and in some countries, pulmonary infection with NTM has become more important than TB (19). From an epidemiological point of view and because treatment regimens differ between the mycobacterial species, species identification has become an important additional task for the clinical laboratory and guides therapeutic decision-making.

Traditionally, mycobacteria were identified by phenotypic methods, based on culture, such as morphological characteristics, growth rates, preferred growth temperature, pigmentation and series of biochemical tests for instance niacin accumulation (*M. tuberculosis*), reduction of nitrates, Tween 80 hydrolysis, catalase, aryl-sulfatase and urease activity and iron uptake. Testing is laborious, time-consuming and not without biosecurity risks. In addition, misidentification may occur because different species may have indistinguishable morphological and biochemical profiles.

Identification based on DNA technology

In the last decade, molecular methods have been developed for the rapid and reliable identification of many mycobacterial species. A relative easy “in house” method is based on PCR and restriction enzyme analysis (PRA) of the gene coding for the heat shock protein *hsp65* (20). This gene is present in all the mycobacterial species and restriction enzyme patterns generated with two enzymes (HaeIII and BstEII) of a PCR product of 439 bp of the *hsp65* gene can be compared with patterns available in a database for species identification; the so-called PRA site, with the profiles of almost all mycobacterial species (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

Another “in house” method is the sequencing of the 16S ribosomal RNA gene, the reference standard to which all other new identification techniques are generally compared (23). The PCR for the amplification of the 16S rRNA gene can be done with “in house” methods or a commercially available kit: the MicroSeq 500 16S ribosomal DNA (rDNA) bacterial sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). This kit is based on PCR and sequencing of the first 500 bp of the bacterial rRNA. Sequencing can be done easily and cheaply with commercial available sequencing service providers (approximately \$5 USD per sequencing). Identification requires a single sequencing reaction, which is efficient and cost-effective. For the final species identification, the obtained sequence can be compared in available public databases; the EzTaxon database (<http://www.ezbiocloud.net/>) or the sequence analysis tools (GenBank) offered by the National Center for Biotechnology Information (NCBI; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

There are several other commercial systems available for the identification of mycobacteria. The first commercially available method was the AccuProbe (Gen-Probe Inc.), based on species-specific DNA probes with a chemiluminescent label that hybridize to the ribosomal RNA of the target organism. The test is easy to perform and makes possible rapid identifications. The results of the test are read with a luminometer. Separated tests for the identification of several important mycobacteria are available, including the *M. tuberculosis* complex, *M. avium*, *M. intracellulare*, the *M. avium* complex, *M. kansasii* and *M. goodii*.

More recently, other molecular commercial systems have been introduced for the rapid identification of *M. tuberculosis* complex and NTM: the INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics NV, Ghent, Belgium), and the Geno-Type MTBC and GenoType Mycobacterium CM/AS tests (Hain Lifesciences, Nehren, Germany). These tests are

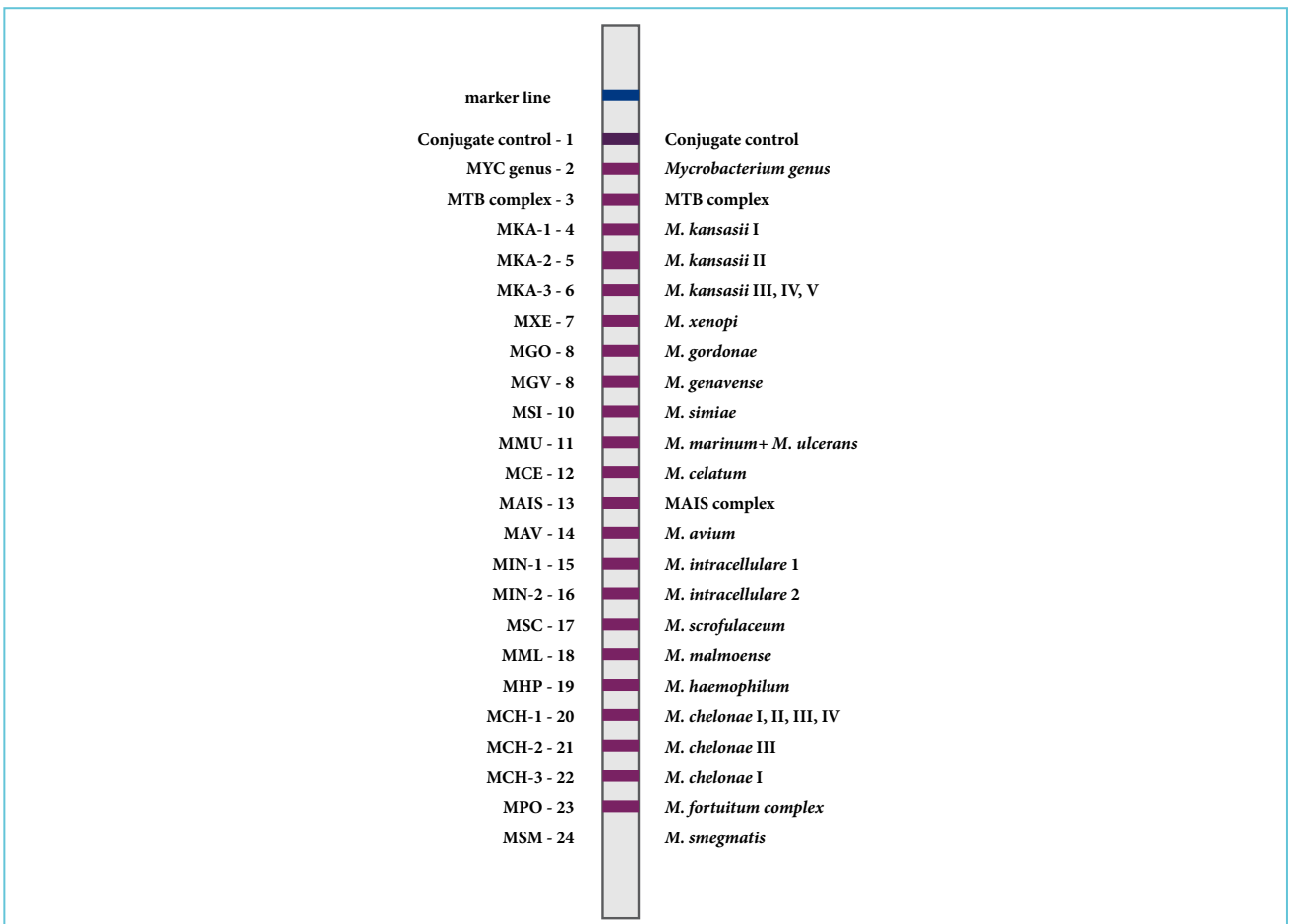
so called “reverse line probe” assays and detect the presence of certain DNA loci, representative for the species, in a hybridization assay with a PCR product of the isolated microorganism. (see Figure 3). INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 is a line probe assay that simultaneously detects and identifies the genus *Mycobacterium* including the *M. tuberculosis* complex and 16 different mycobacterial species.

The test is based on the nucleotide differences in the 16S-23S rRNA spacer region and can be

performed starting from either liquid or solid culture. The GenoType MTBC and GenoType *Mycobacterium* CM and AS assays are also reverse line probe hybridization assays. The GenoType MTBC is intended for the differentiation of members of the *M. tuberculosis* complex, including *M. bovis* BCG.

The GenoType *Mycobacterium* CM and AS assays are for the identification of 40 of the most common NTM species including *M. tuberculosis* complex. The CM tests permits the

Figure 3 Strip design of a reverse line probe assay: The INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 test



On the strip are covalently attached, in parallel lines, 23 oligonucleotides probes, representing species-specific DNA regions of 16 different NTM species and *M. tuberculosis* complex strains. Some species like *M. kansasii* and *M. chelonae* have more than one probe on the strip because these species have more than one probe sequence type. A labeled PCR product of the tested mycobacterium is incubated with the strip and permitted to hybridize against homologous sequences causing a visible hybridization band on the strip.

simultaneous molecular genetic identification of the *M. tuberculosis* complex and 24 of the most common NTM species while the AS test permits the simultaneous molecular genetic identification of 19 additional NTM species. In general, molecular methods offer several advantages over conventional techniques for the rapid detection and identification of *M. tuberculosis* complex strains and other mycobacteria, such as a short turnaround time for the result (5-48 hours), reliability and reproducibility. The use of these molecular methods improves patient management and has been recommended by the WHO.

Identification based on immunochromatography

Three rapid immunochromatographic assays have been developed to differentiate between *M. tuberculosis* complex strains and MNT: the BD's MGIT TBc ID, the Taun's Capilia TB

(Japan) and the SD Bioline TB Ag MPT64 Rapid Test (Korea).

The three tests are lateral flow immunochromatographic assays (Figure 4). The BD and the SD Bioline assays detect MPT64 antigen, while Capilia detects MPB64 antigen; both *Mycobacterium tuberculosis* complex-specific secretory proteins. Both liquid mediums and solid mediums can be used as samples although the BD assay has been developed for the use with MGIT cultures. For solid mediums, an extraction buffer is required (24). An internal positive control is included to validate proper test performance. Reading time of the tests is 15 min and no special equipment required. These tests have been shown to be highly sensitive (>95%) and specific (> 95%) in a number of studies conducted in clinical settings (24).

Figure 4 An example of a positive lateral flow test for identification of a *M. tuberculosis* strain grown on solid Lowenstein Jensen medium



Adapted from: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/rapid_speciation_test.html

DRUG SENSITIVITY TESTING (DST)

The emergence and spread of multidrug-resistant tuberculosis (MDR-TB) and extensively drug-resistant tuberculosis (XDR-TB) are a major medical and public health problem. MDR-TB is TB which is at least resistant to the two first-line anti-TB drugs rifampicin and isoniazid. XDR-TB is defined as TB that is resistant to any fluoroquinolone and at least one of the three injectable second-line drugs (capreomycin, kanamycin and amikacin) in addition to rifampicin and isoniazid. Earlier detection of drug resistance is important and reduces the time from TB diagnosis to the start of a proper TB treatment, improving patient outcomes and helping to control the transmission of resistant strains in the population. Conventional methods for drug susceptibility testing (DST) are slow. The most commonly used method, the standard proportion method, on Löwenstein-Jensen medium or Middlebrook agar, requires 4 – 8 weeks to produce results. This standard proportion is a so-called “indirect method”, requiring a sequential procedure: isolation of mycobacteria from the clinical specimen, identification of *M. tuberculosis* complex, and in vitro testing of strain susceptibility in the presence of anti-TB drugs. In the last 15 years, several other culture- and molecular-based methodology has been developed and some of these methods are “direct methods” using the specimens from the patient and evading the time necessary to isolate *M. tuberculosis* in pure culture from clinical specimens (25, 26)

Non-commercial “in house” culture-based DST methods

In house methods have been proposed for the rapid detection of drug-resistance, aimed at use in low-income settings. Among these methods are microscopic observation of drug susceptibility (MODS), thin layer agar (TLA), colorimetric redox indicator (CRI) methods and the nitrate

reductase assay (NRA) (27-30). These methods can report susceptibility results in 1-2 weeks after inoculation.

In both MODS and TLA testing, drug-free and drug-containing media (liquid medium for MODS, solid for TLA) are directly inoculated with specimens from patients. Thus, no growth is first isolated in pure culture from clinical specimens. Cultures are microscopically examined for early growth or micro-colonies. Growth in drug-free media indicates a positive culture and growth in both drug-free and drug-containing media indicates resistance.

Colorimetric redox indicator (CRI) methods are indirect methods and thus need a pure culture from clinical specimens. These methods are based on the reduction of a colored indicator added to liquid culture medium in a microtiter plate after *M. tuberculosis* has been preincubated for several days in vitro to different antibiotics and different drug concentrations. Resistance is detected by a change in color of the indicator, which is proportional to the number of viable mycobacteria in the medium. Among the different growth indicators used are the redox-indicators Alamar blue and Resazurin.

Nitrate reductase assay (NRA) is a solid culture technique based on the capacity of *M. tuberculosis* to reduce nitrate to nitrite, which is detected by adding a specific reagent (Griess reagent) to conventional Löwenstein-Jensen (LJ) medium into which 1 mg/ml of potassium nitrate (KNO₃) has been incorporated. The NRA test can be used as a direct or indirect test. The reduction of nitrate is detected by a colored reaction. Resistance testing is done by inoculating directly the patient samples or a pure culture of *M. tuberculosis* on media with and without antibiotics. Detection of the colored reaction on the drug-free medium indicates a positive culture and a colored reaction in both drug-free and drug-containing media indicates resistance.

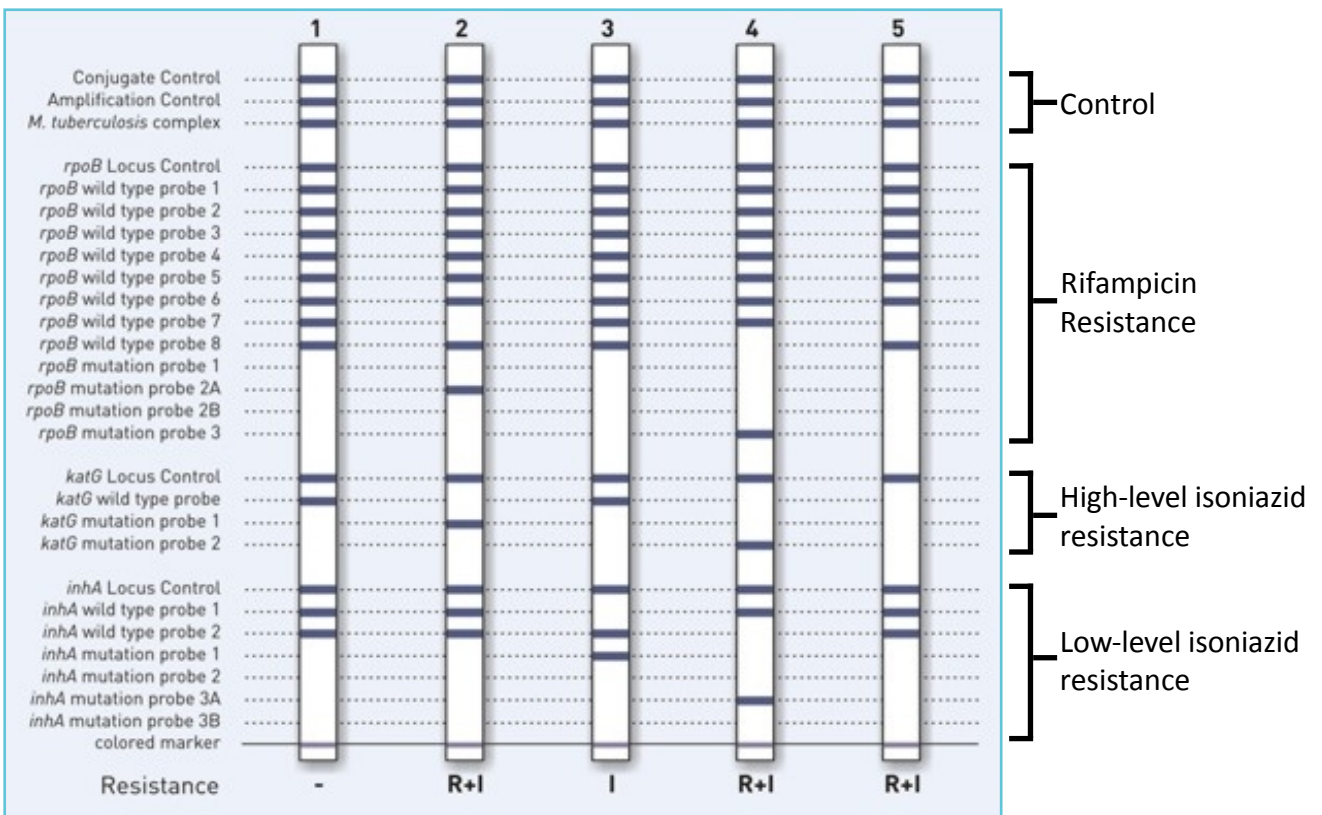
MODS, CRI methods and the NRA, but not TLA testing, have received WHO approval. These methods have similar accuracy to commercial liquid culture systems and can be implemented in high-burden, low-income settings with minimum costs. However, these tests require extensive operator training, standardization and quality assurance before implementation (25, 26).

Commercial liquid culture DST methods

The most commonly used commercially available automated liquid culture DST system is the BACTEC MGIT 960 system with the BACTEC MGIT 960 SIRE kit (Becton Dickinson, Franklin Lakes,

New Jersey, USA). This is an indirect method for the susceptibility testing of first-line antibiotics (isoniazid, rifampin, ethambutol, and pyrazinamide). The test is performed with *M. tuberculosis* complex positive culture inoculated in liquid medium with and without drugs and could report susceptibility results in 1-2 weeks after inoculation. The method has been demonstrated to be equivalent to the proportion method standard and has been FDA approved and endorsed by the WHO. Other automated liquid culture systems capable of DST include the Bact/ALERT MB (bioMerieux Inc., Durham, North Carolina, USA) system and the VersaTREK system (Trek

Figure 5 An example of a reverse line blot assay, the Genotype MTBDRplus strip



Shown here are the results for DST of five strains of the *M. tuberculosis* complex. (1) a susceptible strain; (2) a strain resistant to rifampicin and with high-level resistance to isoniazid; (3) a strain susceptible to rifampicin and low-level isoniazid resistance; (4) a strain resistant to rifampicin and a high- and low-level mutation for isoniazid; (5) a strain resistant to rifampicin and with high-level resistance to isoniazid. The strip contains 27 bands: 21 bands are to detect mutations in regions of genes associated with resistance (eleven bands detect wild type loci and ten bands detect antibiotic resistance loci). Six bands on the strip are control bands: control conjugate, amplification control, *M. tuberculosis* complex control and the amplification controls of the loci of the genes **rpoB**, **katG** and **inhA**.

Diagnostic Systems, West Lake, Ohio, USA). The use of these commercial systems for “direct susceptibility testing”, inoculating smear-positive patient specimens directly in culture medium with drugs would potentially reduce reporting of DST results with 1 to 3 weeks. However, direct testing of clinical specimens is problematic due to the risk of bacterial contamination, resulting in assay failure rates of about 15%. For this reason, most laboratories rely on the indirect method for susceptibility testing.

Rapid molecular DST methods

Much research effort has been put in describing the mutations present in the genes of *M. tuberculosis*, associated with resistance to the anti-TB drugs. This knowledge has enabled the development of rapid, DNA-based, so called molecular line probe assays, which allow for the simultaneous detection of *M. tuberculosis* complex and the detection of mutations associated with rifampicin resistance (alone or in combination with isoniazid). These assays are based on PCR and can be used directly with clinical specimens providing results within 24 to 48 hours; an enormous improvement on the 1 to 2 months needed for culture-based DST. Using a culture or a clinical sample, positive for *M. tuberculosis*, the region of a gene associated with resistance is amplified with PCR followed by a second assay to determine if the sequence contains a mutation associated with resistance. This is done with a hybridization assay. The labeled PCR products are hybridized to oligonucleotide probes immobilized on a nitrocellulose strip. Mutations are detected by lack of binding to wild-type probes or by binding to probes specific for commonly occurring mutations (see Figure 5).

Currently, two commercial line probe assays exist, the INNO-LiPA1 Rif.TB (Innogenetics, Ghent, Belgium) and GenoType MTBDRplus® (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Germany). The LiPA

test detects simultaneously Mycobacterium tuberculosis complex and resistance to rifampicin. The GenoType MTBDRplus assay detects resistance to rifampicin and high- and low-level isoniazid resistance (Figure 5). In both tests, the identification of rifampicin resistance is enabled by the detection of the most significant mutations of the *rpoB* gene (coding for the β -subunit of the RNA polymerase). For testing the high-level isoniazid resistance, the *katG* gene (coding for the catalase peroxidase) is examined and for testing the low level isoniazid resistance, the promoter region of the *inhA* gene (coding for the NADH enoyl ACP reductase) is analyzed. Recently the GenoType MTBDRsl test has been released designed to test for resistance to second-line anti-TB drugs (fluoroquinolones, ethambutol, aminoglycosides and cyclic peptides). This test can be used in combination with the MTBDRplus test to identify XDR-TB

The WHO has issued a recommendation for the use of molecular LiPA for the rapid diagnosis of MDR-TB in high TB-burden, low-income settings. Evaluation and demonstration studies indicate that the Line Probe Assays are highly accurate in detecting MDR-TB in a variety of geographical settings, and cost-effective when compared with TB culture followed by DST (31-33).

CONCLUSIONS AND DISCUSSION

In the past decades, several molecular methods have been developed for direct detection, species identification, and rapid drug susceptibility testing of mycobacteria. These methods reduce the diagnostic time of TB from weeks to days. Some techniques are simple, but others are technically demanding and increase the costs of the diagnosis considerably. Several of these novel methods have been endorsed by the WHO and have shown their potential to significantly improve case detection and management of patients, including drug-resistant TB

cases (34, 35). However, for most resource-poor countries, with high rates of TB, where the technology will be most needed, the new technology is just too expensive and requires a complex technical infrastructure. According to reports of the WHO, eighty percent of all cases worldwide, occur in 22 high-burden, mainly resource-poor settings. In most of these countries, the TB diagnosis is done with smear microscopy only and in addition, laboratories are marginalized by their TB programs, understaffed and with untrained personnel and inadequate or poorly maintained equipment. Quality assurance programs for these laboratories including quality control and external quality assessments (EQAs) are often lacking (36). Priority for these countries is the improvement of the national laboratory system providing good-quality microscopy and the access to conventional culture and drug susceptibility testing (DST).

Another important point is that the new technology cannot replace the standard diagnostic methods; culture and conventional DST. Culture remains necessary for the diagnosis of TB in smear negative patients and conventional DST is required to confirm the molecular detection of resistance. Molecular detection of resistance depends on the detection of the resistance-conferring mutation. However, alternate mechanisms of resistance may develop or mutations may appear for which the test was not designed to detect. Thus, to provide reliable and fast results for TB diagnostics and patient care, a combination of tests that include smear staining using a fluorescence microscopy, liquid and solid medium culture methods, and a molecular assay for TB identification and drug resistance detection are necessary. Of course, the implementation of all of these tools in routine laboratory practice requires the implementation of appropriate quality assurance systems.

Some main problems in TB diagnosis has not been resolved with the introduction of the new

techniques. There is still the need to increase the sensitivity of TB detection among patients with extrapulmonary TB or paucibacillary disease, among immunocompromised (HIV) patients and among children. There is also a great need for a simple, low-cost, point-of-care assay for use in primary health clinics, which see the majority of TB patients but cannot provide laboratory-confirmed diagnosis of TB (37). To have an impact on the TB problem in these resource-limited settings, the ideal TB diagnostic would be a sensitive, specific, inexpensive real-time test. Progress toward a robust point-of-care test has been limited, but perhaps in a near future, novel biomarkers that can be measured by point-of-care tests, will enable the diagnosis of active TB with a simple real-time test. Several new point-of-care tests for TB including improved serologic assays, hand-held molecular devices, breath-based assays for the detection of volatile organic compounds in the diseased patient, microchip technologies and proteomics-based and metabolomics-based tests are in investigation (34, 37). As the technology advances, new point-of-care tests for TB and drug-resistant TB tests will become available on the market and, hopefully, prices for such tests will become affordable for low-income settings where the budget to health care is less from the ideal.

REFERENCES

1. WHO. Global tuberculosis report 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed Sept 12, 2015).
2. Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselring AC, Beyers N, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis* 2008;47: 203–207.
3. Hanscheid T The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102: 520–521.
4. Somoskövi A, Ködmön C, Lantos A, Bártfai Z, Tamási L, Füzy J, Magyar P. Comparison of recoveries of *mycobacterium tuberculosis* using the automated BACTEC MGIT

- 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2395-2397.
5. Heifets L, Linder T, Sanchez T, Spencer D, Brennan J. Two liquid medium systems, mycobacteria growth indicator tube and MB redox tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1227-1230.
6. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4167-4170.
7. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, Scagnelli M, Rigon A, Ruggiero G, Goglio A. Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):651-657.
8. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2000;49:593-594.
9. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One.* 2008;3(2):e1536.
10. The use of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay (TB-LAMP) for the detection of tuberculosis. 2013. WHO/HTM/TB/2013.05. Geneva. Retrieved from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/83142/1/WHO_HTM_TB_2013.05_eng.pdf.
11. Cepheid GeneExpert Systems. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/systems/genexpert-systems/genexpert-i>.
12. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 21;1- 166.
13. World Health Organization. TB diagnostics and laboratory strengthening. Retrieved from: <http://who.int/tb/laboratory/mtbrifrollout/en/>.
14. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2011; 8: e1001062.
15. World Health Organization. Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.5. Geneva, Switzerland: WHO, 2011.
16. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM. A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002; 57: 804-809.
17. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D. False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10: 1192-1204.
18. Centers for Disease Control and Prevention. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States, 2010. *MMWR* 2010;59(1-25).
19. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):13-34.
20. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):175-178.
21. Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2882-2889.
22. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth S, Levin M, Scott JA. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid culture. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4343-4346.
23. Palomino JC, Vandamme P, Martin A. Classical and new assays for detecting drug resistance in tuberculosis. *Biomark Med.* 2014;8(9):1105-1114.
24. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(2):103-111.
25. Minion J, Leung E, Menzies D, Pai M. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(10):688-698.
26. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(1):56-64.
27. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2007;59(2):175-183.
28. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(4):500-505.

29. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 1-9.
30. Ling D, Zwerling A, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis, *Eur Respir J*. 2008; 32: 1165–1174
31. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy, *Expert Review of Respiratory Medicine* 2008;2(5):583-588.
32. Boehme CC, Saacks S, O'Brien RJ. The changing landscape of diagnostic services for tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med*. 2013;34(1):17-31 .
33. Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *J Clin Microbiol*. 2011;49(3):772-776.
34. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, Spector S, Roscigno G, Nkengasong J. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev*. 2011;24(2):314-350.
35. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis*. 2012;15;205 Suppl. 2:S147-58.

Recientes avances en el diagnóstico de tuberculosis en el laboratorio clínico

Rommy Teran¹, Jacobus H. de Waard²

¹ Laboratorio de Microbiología, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

² Programa Prometeo, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Central del Ecuador

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autores correspondientes:

Dr. Rommy Teran

Dr. Jacobus H. de Waard

Facultad de Ciencias Químicas

Universidad Central del Ecuador

Correos electrónicos:

riteran@uce.edu.ec

jacobusdeward@gmail.com

Palabras clave:

tuberculosis, diagnóstico molecular,

test de sensibilidad a drogas (DST),

NAATs, LAMP, Xpert MTB/RIF

Agradecimientos:

El programa Prometeo de la SENESCYT

(Secretaría de Educación Superior,

Ciencia, Tecnología e Innovación del

Ecuador) auspició este trabajo.

RESÚMEN

El laboratorio tiene un papel decisivo en el diagnóstico de tuberculosis (TB) así como en la identificación y determinación de la sensibilidad de *Mycobacterium tuberculosis* a diferentes drogas (DST, del inglés, drug sensitivity testing). El diagnóstico de laboratorio basado solo en microscopía y cultivo, ha sido utilizado por largo tiempo, sin embargo, y debido al lento crecimiento de las micobacterias (3 a 4 semanas), se ha hecho indispensable la búsqueda de nuevos y rápidos métodos de diagnóstico. Desde inicios de los 90s, se dispone de técnicas moleculares para una rápida detección, identificación y DST del *M. tuberculosis*. El presente artículo hace una revisión de la nueva metodología que ha sido introducida en el laboratorio clínico. Nosotros discutimos sobre la microscopía LED y las técnicas basadas en el PCR para el diagnóstico de TB, ensayos inmunológicos para el diagnóstico de TB activa y latente, métodos de cultivo líquido y “line probe assays” para un rápido DST y métodos basados en PCR y ensayos de hibridización para la identificación de micobacterias. Aunque estas nuevas técnicas son útiles para tener un resultado rápido, enfatizamos en que el diagnóstico y seguimiento basado en el cultivo, es todavía el método de referencia

para la tuberculosis y que estas nuevas técnicas moleculares no pueden reemplazarlo, aunque proveen información preliminar y mejoran el manejo del paciente.

INTRODUCCIÓN

La tuberculosis (TB) una de las principales enfermedades infecciosas en el mundo y es responsable por más de 2 millones de muertes y 8 millones de nuevos casos anualmente. La enfermedad es causada por una bacteria llamada *Mycobacterium tuberculosis*. La bacteria usualmente ataca los pulmones, pero podría infectar cualquier parte del cuerpo como los riñones, el intestino, la pleura, la columna vertebral y el cerebro. Y si no es tratada adecuadamente, esta enfermedad infecciosa puede ser fatal.

La estrategia de control más importante para la TB, es la detección temprana y el apropiado tratamiento de casos infecciosos. La tasa de detección de casos (TDC) global es de alrededor del 64%, lo cual implica que alrededor del 36% de casos de TB incidente no son detectados. Esto deja una brecha de aproximadamente 3.3 millones de personas con TB alrededor del mundo que se “perdieron”, tanto porque no fueron diagnosticadas o porque fueron diagnosticadas, pero esto no se reportó (1). Para las Américas, la TDC es alrededor del 79%, lo cual significa que anualmente 33,000 pacientes con TB no son detectados o reportados (1).

Los laboratorios tienen un rol central en el diagnóstico de TB, es así que reforzar su desempeño y capacidad, es prioritario para el control de esta enfermedad. Sin embargo, el diagnóstico de TB en la mayoría de laboratorios se hace por los llamados métodos convencionales y la mayoría de casos de TB son diagnosticados por baciloscopía. La baciloscopía tiene una sensibilidad de cerca del 60-70% de los casos de TB. Adicionalmente, alrededor del 25% de todos los

casos de TB son extrapulmonares y para el diagnóstico de esta presentación de TB, la examinación de esputo no sería aplicable, afectando la detección de estos casos. La implementación del cultivo para el diagnóstico puede mejorar la tasa de detección de TB en un laboratorio en alrededor de un 30 a 40%. El cultivo detecta casos con baja carga micobacteriana y también se solicita en casos en riesgo de ser TB resistentes para evaluar su sensibilidad a diferentes drogas (DST), o en casos donde se sospecha que la enfermedad se debe a otro miembro del género *Mycobacterium*. Estos dos métodos de laboratorio, la baciloscopía y el cultivo, son todavía los “gold standars” para el diagnóstico de TB, siendo el cultivo el método más sensible. Sin embargo, debido al lento crecimiento de las micobacterias, los resultados pueden tardar de 3 a 4 semanas, es así que nuevas y rápidas técnicas de diagnóstico son requeridas para mejorar el diagnóstico de TB y el manejo del paciente.

Desde inicios de los 90s, nuevas técnicas de laboratorio para el diagnóstico de TB y las pruebas de sensibilidad a drogas han sido desarrolladas, basadas en el uso de medios de cultivo líquidos, técnicas de amplificación de ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, nucleic acid amplification tests), hibridización de ADN y técnicas para la detección de mutaciones, y detección de antígenos y anticuerpos. Esta mini revisión pretende ofrecer algo de información general sobre nuevas técnicas de laboratorio que están disponibles actualmente para el diagnóstico de TB activa o la detección de una infección latente por TB. Esta revisión abarca solamente las técnicas más importantes que se han desarrollado. La comparación de métodos no está dentro de los objetivos de este artículo y lectores interesados son referidos a la literatura más especializada.

MEJORAS EN LA BACILOSCOPÍA PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB

La examinación microscópica de muestras de esputo, ha sido la base de la detección de casos de TB por más de 100 años y todavía es el método principal en sitios con presupuestos limitados, donde el diagnóstico de TB se basa únicamente en la tinción de Ziehl-Neelsen y la observación del frotis con el microscopio óptico. Este procedimiento detecta solamente alrededor del 60-70% de los casos de TB. Una alternativa es el uso del microscopio de fluorescencia, que puede ser 10% más sensible que el microscopio óptico, debido a que el bacilo fluorescente puede ser visto a un aumento más bajo y el frotis puede ser examinado en solamente el 25% del tiempo que toma examinarlo con el microscopio óptico. Sin embargo, ha sido difícil implementar este microscopio en el diagnóstico de TB debido al alto costo asociado con la compra de un microscopio con una lámpara de vapor de mercurio, la necesidad de reemplazar frecuentemente esta lámpara de UV, la cual dura solamente 200-300h, y la necesidad de un cuarto oscuro para la lectura de las placas (2).

El desarrollo reciente de la tecnología dio lugar al microscopio de fluorescencia, el mismo que usa un sistema de iluminación basado en la luz emitida por un diodo (LED) con un tiempo de vida útil de hasta diez mil horas, lo cual resulta en la microscopía de fluorescencia LED. Es así que microscopios fluorescentes LED relativamente económicos están disponibles. La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha evaluado la eficacia de la microscopía LED, y los resultados mostraron que el diagnóstico con este microscopio fue más sensible (alrededor del 10%) que con el microscopio óptico (2,3). Basándose en estas consideraciones, la OMS recomienda que la microscopía convencional y la fluorescente sean reemplazadas por la microscopía LED.

EL CULTIVO EN MEDIO LÍQUIDO PARA EL DIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

El “gold standard” para el diagnóstico de TB es todavía el aislamiento de *M. tuberculosis* en un medio de cultivo. El cultivo provee además aislados para identificación (basada en pruebas bioquímicas y moleculares) y para DST. Hasta inicios de los noventa, el cultivo era usualmente hecho en medio sólido basado en huevo como el Lowenstein-Jensen y el medio Stonebrink. Una desventaja del cultivo en estos medios sólidos es el lento crecimiento de la bacteria, que puede tomar al menos de 2 a 4 semanas o a veces más, antes de que el cultivo dé positivo.

Los medios líquidos tienen una incrementada sensibilidad para el crecimiento de *M. tuberculosis* (hasta un 20% de incremento en la positividad) y un reducido tiempo de detección (10-14 días versus 2-4 semanas). El inconveniente es la tasa de contaminación del medio líquido, el cual parece ser más alto en comparación con el sólido (4). La OMS recomienda el uso del medio sólido convencional junto con el medio líquido para el aislamiento primario de micobacterias.

El medio líquido consiste en caldo Middlebrook 7H9 suplementado con 10% de OADC (ácido oleico, albúmina, dextrosa y catalasa) y, para evitar la contaminación con otros microorganismos, se agrega PANTA (una mezcla de antibióticos: polimixina, anfotericina B, ácido nalidíxico, trimetoprim y azlocilina). En la actualidad, se dispone también de sistemas de cultivos elaborados que están disponibles comercialmente. Estos van desde botellas simples y tubos tales como MGIT (BD Diagnostic Systems, USA), Septi-Chek AFB (BD, USA) y MB Redox (Biotest Diagnostics, USA) hasta sistemas semi-automatizados (BACTEC 460TB) y totalmente automatizados (BACTEC 9000 MB), BACTEC MGIT 960 (BD, USA), ESP Culture System II [Trek Diagnostics, USA] y MB/BacT ALERT 3D System (BioMérieux, NC). Para estudios comparativos

de estos sistemas (semi) automatizados, el lector puede referirse a literatura especializada (5, 6, 7).

HERRAMIENTAS BASADAS EN EL ADN PARA EL DIAGNÓSTICO DE TB

Tests clásicos para la amplificación de ácidos nucleicos (NAATs, del inglés, Nucleic Acid Amplification Tests)

Desde inicios de los años noventa, varias metodologías han sido publicadas para la detección de *M. tuberculosis* con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), usando cebadores oligonucleótidos para amplificar un fragmento de ADN específico para este microorganismo. Estos NAATs pueden arrojar resultados en 3-6 horas e incluyen a aquellos comerciales y a los “hechos en casa”, basados en un protocolo desarrollado en un laboratorio no-comercial. Cada NAAT usa un método diferente para amplificar regiones específicas del ácido nucleico del complejo *Mycobacterium tuberculosis*.

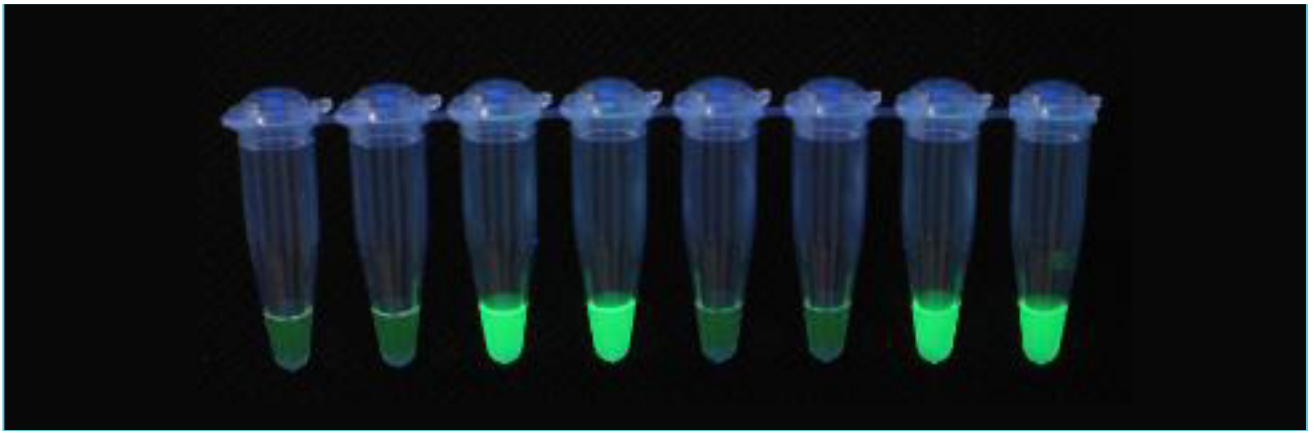
Varios NAATs comerciales existen y la FDA (U.S. Food and Drug Administration) ha aprobado el uso de algunos de ellos para muestras respiratorias solamente. Estos kits incluyen el GenProbe Amplified *M. tuberculosis* Direct test (AMTD), el Roche Amplicor MTB test, el Cobas Amplicor test, el Abbott LCx test, y el BD-ProbeTec (SDA) test (8). Ninguno de estos tests ha sido aprobado para la detección directa de *M. tuberculosis* de muestras extrapulmonares. Aunque toda esta tecnología es rápida y ha demostrado excelente especificidad, su desempeño puede variar y todavía su sensibilidad no iguala a la de los métodos basados en el cultivo, especialmente para muestras con baciloscopia negativa. Un meta-análisis reciente que analizaba la exactitud de los métodos comerciales NAATs, mostró 125 estudios que analizaban muestras con frotis positivos, y determinó que había un alto grado de variabilidad en la exactitud entre

los estudios (9). Este análisis concluye que existe la necesidad de mejorar la exactitud de los NAATs, particularmente la sensibilidad y que NAATs comerciales no pueden ser recomendados para reemplazar el cultivo y la microscopía para el diagnóstico de TB pulmonar (8, 9).

La amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop-Mediated Isothermal Amplification)

Otro ejemplo de NAAT comercial, y que ha sido diseñado recientemente, es la amplificación isotérmica de ácidos nucleicos (LAMP, del inglés, Loop-mediated Isothermal Amplification). La experiencia en investigación de este test es limitada. Este método se fundamenta en la nueva plataforma loop-mediated isothermal amplification (LAMP) de Eiken Chemical Co. en Japón. Esta tecnología amplifica un ADN diana bajo condiciones isotérmicas (alrededor de 65°C) y está diseñado para detectar visualmente ADN de muestras clínicas, en menos de dos horas y con un mínimo de instrumentación. No hay la necesidad de un paso previo de desnaturalización de la doble cadena a su forma simple. La amplificación y detección del ADN se dan en el mismo microtubo. (Figura 1). El relativamente complejo proceso de amplificación se detalla en el sitio web de Eiken, en el que también se incluye una animación de la reacción (<http://loopamp.eiken.co.jp/e/lamp/index.html>). Un grupo experto de la OMS concuerda en que la tecnología LAMP tiene potencial para ser una herramienta diagnóstica rápida de TB, pero que la evidencia disponible de este ensayo es insuficiente para recomendarlo como prueba que sustituya a la microscopía tradicional. Actualmente, en 14 sitios, la OMS conduce estudios independientes para probar el ensayo TB LAMP, evaluando su factibilidad y costo-efectividad. Los resultados se esperan en el año 2015 (10).

Figura 1 Reacciones positivas para LAMP



Reacciones positivas para LAMP se muestran en los dos tubos de la derecha. Amplificación y detección de ADN se dan en mismo tubo. Los dos tubos de la izquierda son negativos. La imagen se tomó bajo luz UV y la fluorescencia se debe a la adición de PicoGreen a todos los tubos, un colorante que se liga al ADN, el cual se integrará al producto amplificado. Este complejo colorante-ADN emitirá fluorescencia bajo luz UV, lo cual hace fácil distinguir entre reacciones positivas y negativas. Adaptado de: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/lamp_assay.html.

El Xpert MTB/RIF test para el diagnóstico de TB resistente a drogas

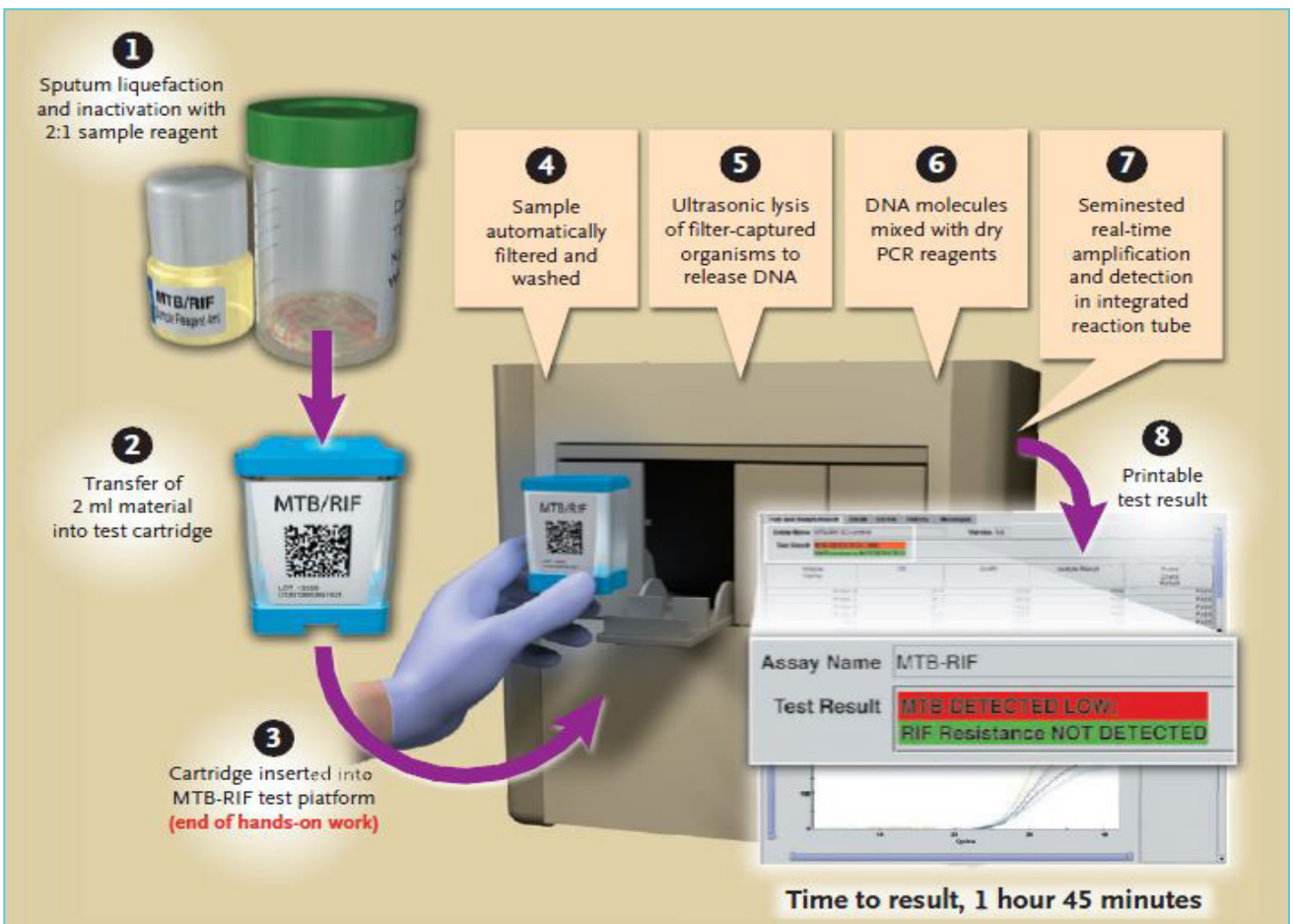
Los métodos NAATs disponibles para la detección de ADN de *M. tuberculosis*, incluyen procesamiento de la muestra de esputo y extracción del ADN como dos pasos separados. El Xpert MTB/RIF integra procesamiento del esputo, extracción de ADN y amplificación en un solo paso de preparación de la muestra (Figura 2). Este método automatizado basado en cartuchos detecta directamente del esputo y en menos de dos horas, simultáneamente el complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina. La tecnología se basa en la plataforma GeneXpert (11). Esta plataforma posibilita la detección de resistencia a la rifampicina a través de la detección de mutaciones en el gen *rpoB*. El sistema cerrado de esta tecnología, disminuye el riesgo de contaminación y no son necesarias instalaciones de bioseguridad especiales. Una revisión sobre la precisión de este método y que incluye 27 estudios, concluye que en comparación con la microscopía, el Xpert® MTB/RIF incrementa la

detección de TB entre casos confirmados por cultivo en un 23%. Para la detección de resistencia a la rifampicina, el Xpert® MTB/RIF muestra una sensibilidad acumulada de 95% y una especificidad acumulada de 98% (12). La OMS recomendó en diciembre del 2010, el uso del Xpert® MTB/RIF y en la actualidad, está promoviendo la introducción global de esta tecnología. Con la finalidad de facilitar el acceso a esta tecnología, el sector público de ciertos países puede adquirir los cartuchos a precios significativamente reducidos. Hasta el 31 de diciembre del 2014, cerca de 4,000 GeneXpert instrumentos y más de 10 millones de cartuchos MTB/RIF han sido adquiridos por el sector público de 116 de los 145 países elegidos para acceder a ese beneficio (13).

SERODIAGNÓSTICO DE TUBERCULOSIS

La detección de anticuerpos contra *M. tuberculosis* en suero, serodiagnóstico, podría ofrecer resultados rápidos a bajo costo, pero desafortunadamente, los tests de los que se dispone

Figura 2 Procedimiento para la tecnología MTB/RIF



De: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/automated_naot.html

actualmente tienen aplicación limitada, debido a la reacción cruzada y baja sensibilidad.

La detección de anticuerpos es relativamente simple y es un método costo - efectivo, pero recientes meta-análisis y revisiones sistemáticas concluyen que las pruebas serológicas comerciales disponibles, proveen resultados inconsistentes (14). La OMS actualmente no aprueba su uso para el diagnóstico de TB pulmonar ni extrapulmonar (15). Más investigación es necesaria para desarrollar tests basados en la respuesta inmune o en el serodiagnóstico y que tengan un desempeño adecuado.

DIAGNÓSTICO DE INFECCIÓN LATENTE POR *M. TUBERCULOSIS*

Personas con infección latente por TB están infectadas por *M. tuberculosis* pero no tienen la enfermedad. Alrededor del 30% de la población mundial está infectada con *M. tuberculosis* y hasta hace poco, esto podía ser detectado con el test de la tuberculina (TST, del inglés, tuberculin skin test), también llamado test de Mantoux. Este test se hace inyectando intradérmicamente una pequeña cantidad de proteína derivada purificada de *M. tuberculosis* (PPD, del inglés, purified protein derivative) en la piel de la parte interna del antebrazo. Si ha habido

exposición previa a *M. tuberculosis*, una induración se desarrollará en el sitio de la inyección dentro de 2 días.

El test no diferencia entre infección latente y enfermedad activa y sus limitaciones, incluyendo la baja sensibilidad y especificidad, han sido bien documentadas. Resultados falsos positivos en el TST pueden resultar por contacto con micobacterias no tuberculosas o vacunación con el Bacilo de Calmette-Guerin (BCG), debido a que la PPD, una preparación de proteína cruda, contiene antígenos que están también presentes en BCG y en ciertas micobacterias no tuberculosas (16, 17). Sin embargo, el test en piel todavía permanece como el más empleado para identificar la infección de TB o el estado inmunológico del paciente frente a la infección.

Reconocer que el interferón gamma (IFN- γ) tiene un papel crítico en regular la respuesta inmune mediada por células, frente a la infección por *M. tuberculosis*, condujo al desarrollo de pruebas alternativas para la detección de la infección de TB; ensayos de liberación de IFN- γ (IGRAs, del inglés, IFN- γ - release assays). IGRAs consisten en tests in vitro en sangre que mide la respuesta inmune mediada por células; de hecho se mide la liberación de interferón (IFN- γ) por las células T luego de la estimulación de una muestra del sangre del paciente con antígenos específicos de TB, ESAT-6 y CFP-10, únicos para *M. tuberculosis*. En otras palabras, IGRAs detecta la sensibilización a *M. tuberculosis* midiendo la liberación de IFN- γ en respuesta a antígenos representativos de *M. tuberculosis*. Hay dos IGRAs disponibles comercialmente; Quantiferon TB Gold tests, Cellestis, Victoria, Australia y T-SPOT.TB, Oxford Immunotec, Abington, UK. Varios estudios publicados han demostrado un mejor desempeño de estos tests sobre el TST en el diagnóstico de infección por *M. tuberculosis* (18). A pesar de la evidencia de estos estudios, el no tener un estándar de referencia para la infección, hace difícil acceder a la verdadera

exactitud de estos ensayos. IGRAs no puede distinguir entre infecciones de TB activas y latentes y no debería ser usado para el diagnóstico de TB activa.

Identificación de especies de *Mycobacterium*

El género *Mycobacterium* comprende más de 150 especies y varias nuevas especies de micobacterias no tuberculosas (MNT) patogénicas han sido descritas en los últimos 20 años. Aunque la mayoría de casos de TB a nivel mundial son causados por *M. tuberculosis*, cada especie del complejo *M. tuberculosis* puede causar tuberculosis en humanos; por ejemplo *M. bovis* transmitido por el ganado o *M. caprae* por las cabras. Las especies de MNT más frecuentemente asociadas con enfermedad pulmonar son *M. avium*, *M. kansasii* y *M. abscessus* y en algunos países infecciones por MNT han sido más importantes que la misma TB (19). Desde el punto de vista epidemiológico y debido a que el tratamiento difiere dependiendo de la especie de micobacteria, la identificación en el laboratorio clínico es definitivamente importante.

Tradicionalmente, las micobacterias fueron identificadas por métodos fenotípicos, basado en el cultivo, tales como características morfológicas, tasas y temperaturas de crecimiento, pigmentación y una serie de pruebas bioquímicas como la acumulación de niacina (*M. tuberculosis*), reducción de nitratos, hidrólisis de Tween 80, actividad de arilsulfatasa y ureasa e ingesta de hierro. Sin embargo, la identificación por estos métodos es laboriosa, consume tiempo e implica riesgo biológico, sumado a que una incorrecta identificación puede ocurrir, ya que diferentes especies pueden tener perfiles morfológicos y bioquímicos no distinguibles.

Identificación basada en la tecnología ADN

En la última década, métodos moleculares han sido desarrollados para la rápida y fiable identificación de especies de micobacterias. Un

método relativamente fácil se basa en el PCR y análisis de enzimas de restricción (PRA, del inglés, PCR and restriction enzyme analysis) de los genes codificados por la proteína de shock térmico *hsp65* (20). Este gen está presente en todas las especies de micobacterias, y los patrones generados por dos enzimas (*HaeIII* y *BstEII*) de un producto de PCR de 439 pares de bases del gen *hsp 65*, pueden ser comparados con patrones disponibles en la base de datos para la identificación de especies; también llamado sitio PRA, con perfiles para casi todas las especies micobacterianas (<http://app.chuv.ch/prasite/index.html>).

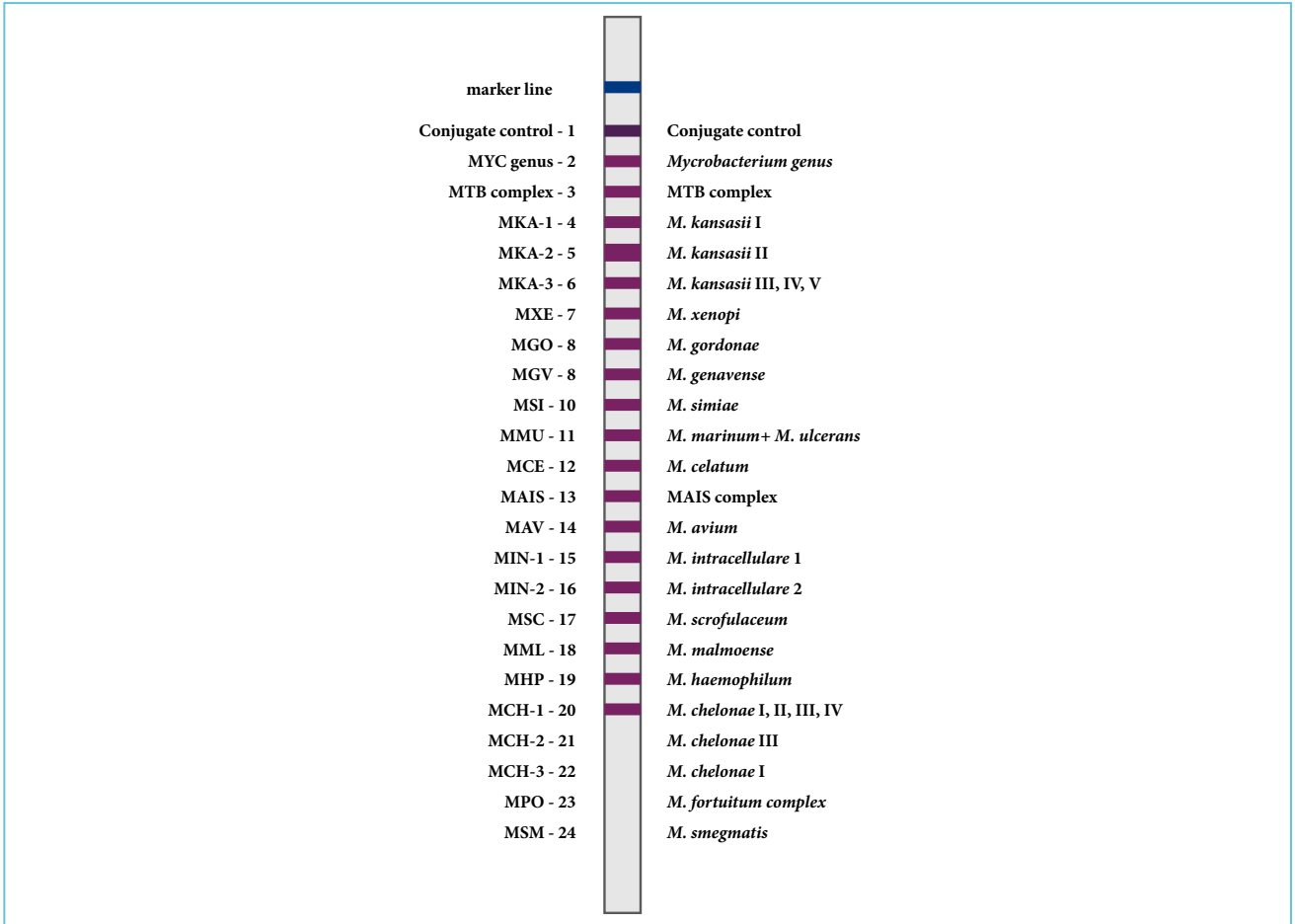
Otro método es la secuenciación del gen 16S ARN ribosomal, el estándar de referencia frente al cual todos las nuevas técnicas de identificación generalmente se comparan (23). El PCR para la amplificación del gen 16S ARNr puede hacerse por métodos convencionales o con kits disponibles comercialmente como el MicroSeq 500 16S ribosomal DNA (rDNA) bacterial sequencing kit (Applied Biosystems, Foster City, Calif.). Este kit se basa en el PCR y la secuenciación de las primeras 500 pares de bases del ARNr bacteriano. El secuenciamiento puede hacerse fácil y económicamente con proveedores del servicio de secuenciación disponibles comercialmente (aproximadamente \$5 USD por secuencia). La identificación requiere una sola reacción de secuenciación, lo cual es costo-efectivo. Para la identificación final de especies, la secuencia obtenida puede ser comparada con bases de datos públicas disponibles; la base de datos EzTaxon (<http://www.ezbiocloud.net/>) o el (GenBank) del NCBI (National Center for Biotechnology Information; <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Hay varios sistemas comerciales disponibles para la identificación de micobacterias. El primer método disponible fue el AccuProbe (Gen-Probe Inc.), basado en sondas de ADN

específicas con un marcador quimioluminiscente que se hibridiza al ARN ribosomal del organismo blanco. El test es fácil de realizar y hace posible una identificación rápida. Los resultados son leídos con un luminómetro. Test individuales para la identificación de varias importantes micobacterias están disponibles, incluyendo el complejo *M. tuberculosis*, *M. avium*, *M. intracellulare*, el complejo *M. avium*, *M. kansasii* y *M. goodnae*.

Más reciente es la introducción de otros sistemas moleculares para la rápida identificación del complejo *M. tuberculosis* y MNT: el INNO- LiPA MYCOBACTERIA v2 (Innogenetics NV, Ghent, Belgium), y el GenoType MTBC and GenoType Mycobacterium CM/AS (Hain Lifesciences, Nehren, Germany). Estos tests son también llamados ensayos de sonda de línea reversa (reverse line blot assay en inglés) y detectan la presencia de ciertos loci de ADN, representativos de especies, en un ensayo de hibridización con un producto de PCR del microorganismo aislado. (Figura 3). INNO-LiPA MYCOBACTERIA v2 es un ensayo de sonda de línea que simultáneamente detecta e identifica el complejo *M. tuberculosis* y 16 diferentes especies micobacterianas. El test se basa en diferencias de nucleótidos en la región espaciadora 16S-23S ARNr y puede ser realizado a partir de un cultivo en medio sólido o líquido. El GenoType MTBC y el GenoType Mycobacterium CM and AS son también ensayos de sonda de línea. El GenoType MTBC pretende la diferenciación de miembros del complejo *M. tuberculosis*, incluyendo *M. bovis* BCG. El GenoType Mycobacterium CM and AS pueden identificar 40 de las especies más comunes de MNT, incluyendo al complejo de *M. tuberculosis*. El GenoType Mycobacterium CM permite la identificación genética molecular simultánea del complejo *M. tuberculosis* y de 24 de las especies de MNT más comunes, mientras que el GenoType Mycobacterium

Figura 3 Diseño de una tira de ensayo de sonda de línea reversa: EI INNO-LiPA® MYCOBACTERIA v2 test



En la tira están covalentemente unidos, en líneas paralelas, 23 sondas de oligonucleótidos, que representan regiones específicas de ADN de diferentes especies de MNT y cepas del complejo *M. tuberculosis*. Algunas especies como *M. kansasii* y *M. chelonae* tienen más de una sonda en la tira porque estas especies tienen más de un tipo de secuencia de una región específica. Un producto de PCR marcado de la micobacteria de prueba, es incubado con la tira y se permite la hibridización contra secuencias homólogas, lo que se evidencia con una banda visible de hibridización en la tira.

AS identifica 19 especies adicionales de MNT. En general, los métodos moleculares ofrecen varias ventajas sobre las técnicas convencionales para la rápida detección e identificación de cepas del complejo *M. tuberculosis* y de otras micobacterias, como son el corto tiempo para tener resultados (5-48 horas), confianza y reproducibilidad. El uso de estos métodos moleculares mejora el manejo del paciente y han sido recomendados por la OMS.

Identificación basada en inmunocromatografía

Tres ensayos rápidos inmunocromatográficos han sido desarrollados para diferenciar entre cepas del complejo *M. tuberculosis* y MNT; el BD's MGIT TBc ID, el Tauns' Capilia TB (Japan) y el SD Biotec TB Ag MPT64 Rapid Test (Korea).

Los tres son ensayos inmunocromatográficos de flujo lateral (Figura 4). El BD y el SD Biotec detectan el antígeno MPT64, mientras que el Capilia

Figura 4 Un ejemplo de un test inmunocromatográfico de flujo lateral positivo para la identificación de cepas del complejo *M. tuberculosis* en el medio sólido Löwenstein Jensen



Adaptado de: http://www.finddiagnostics.org/programs/tb/find_activities/rapid_speciation_test.html

detecta el antígeno MPB64; ambas proteínas secretoras específicas del complejo *M. tuberculosis*. Tanto medios sólidos como líquidos pueden ser usados como muestras, aunque el BD ha sido desarrollado para usarse con cultivos líquidos (MGIT). Si se usan cultivos sólidos, una solución tampón es requerida (24). Un control positivo interno es incluido para validar la prueba. El tiempo de lectura es de 15 minutos y no se requiere de equipamiento especial. Este test ha mostrado ser altamente sensible (> 95%) y específico (> 95%) en varios estudios clínicos (24).

TEST DE SENSIBILIDAD A DROGAS (TSD, DEL INGLÉS, DRUG SENSITIVITY TESTING)

El surgimiento y diseminación de la tuberculosis multirresistente (TB-MR) y de la tuberculosis extensamente resistente (TB-ER) son un importante problema médico y de salud pública. La TB-MR es un tipo de tuberculosis, resistente

al menos a dos de los antibióticos de primera línea, rifampicina e isoniazida. La TB-ER se define como la TB que en adición a la rifampicina e isoniazida, es resistente a cualquier fluoroquinolona y al menos a una de las tres drogas inyectables de segunda línea (capreomicina, kanamicina y amikacina). La detección temprana de la resistencia a drogas es importante y reduce el tiempo desde el diagnóstico de TB, al inicio de un tratamiento apropiado, mejorando la recuperación del paciente y también ayudando al control de la transmisión de cepas resistentes en la población. Los métodos convencionales para establecer la sensibilidad a drogas son lentos. El más usado, el método estándar de proporciones, en medio Löwenstein-Jensen o en agar Middlebrook, requiere de 4 a 8 semanas para dar resultados. El método estándar de proporciones es también llamado "método indirecto", ya que requiere un procedimiento secuencial: aislamiento de micobacterias de las

muestras clínicas, identificación del complejo *M. tuberculosis*, y las pruebas de susceptibilidad in vitro en presencia de drogas anti-TB. En los últimos 15 años, otros métodos basados en cultivo y biología molecular han sido desarrollados y algunos de ellos son “métodos directos” en los que se usan los especímenes del paciente directamente, evadiendo el tiempo necesario para aislar *M. tuberculosis* en cultivos puros (25, 26).

Métodos no comerciales de DST basados en cultivo

Métodos basados en cultivo han sido propuestos para la detección rápida de la resistencia a drogas, propuestos para ser usados en lugares de bajo presupuesto. Entre estos métodos están la observación microscópica de la resistencia a drogas (MODS, del inglés, microscopic observation of drug susceptibility), agar de capa fina (TLA, del inglés thin layer agar), métodos colorimétricos con indicador redox (CRI, del inglés, colorimetric redox indicator) y el ensayo de nitrato reductasa (NRA, del inglés, nitrate reductase assay) (27-30). Estos métodos pueden reportar resultados de susceptibilidad 1 a 2 semanas luego de la inoculación.

En los métodos MODS y TLA, medios libres de drogas y medios que las contienen (líquidos para MODS y sólidos para TLA), son inoculados directamente con especímenes de pacientes. De esta manera no hay primero el crecimiento en cultivos puros. Los cultivos son microscópicamente examinados para el crecimiento temprano de micro-colonias. Crecimiento en el medio libre de drogas indica un cultivo positivo, y el crecimiento en ambos medios indica resistencia.

Los métodos colorimétricos con indicador redox (CRI) son métodos indirectos, de tal manera que necesitan un cultivo puro de los especímenes clínicos. Estos métodos se basan en la

reducción de un indicador adicionado al cultivo líquido en una microplaca donde el *M. tuberculosis* ha sido preincubado por varios días in vitro y frente a diferentes concentraciones de drogas. La resistencia es detectada por un cambio de color en el indicador, lo cual es proporcional al número de micobacterias viables en el medio. Entre los indicadores de crecimiento usados como indicadores redox están el azul de alamar y la resazurina.

El ensayo de nitrato reductasa (NRA) es una técnica en cultivo sólido basado en la capacidad de *M. tuberculosis* de reducir nitratos a nitritos, lo cual es detectado al adicionar un reactivo específico (Griess reagent) al medio convencional Löwenstein-Jensen (LJ) que contiene 1 mg/ml de nitrato de potasio (KNO₃). La reducción de nitrato es detectada por una reacción coloreada. Este método puede ser directo o indirecto. La prueba de resistencia se hace inoculando directamente las muestras del paciente o el cultivo puro de *M. tuberculosis* en el medio que contiene antibióticos. Una reacción coloreada en el medio libre de drogas solamente, indica un cultivo positivo y el crecimiento en ambos medios, con y sin drogas, indicaría resistencia.

Los métodos MODS, CRI y el NRA, recibieron la aprobación de la OMS, no así el TLA. Estos métodos tienen similar exactitud que los sistemas comerciales de cultivo líquido y podrían ser implementados a costos mínimos en lugares de bajos ingresos y con alta cantidad de muestras. Sin embargo, estas pruebas requieren un extenso entrenamiento del operador así como estandarización y aseguramiento de la calidad antes de su implementación (25, 26).

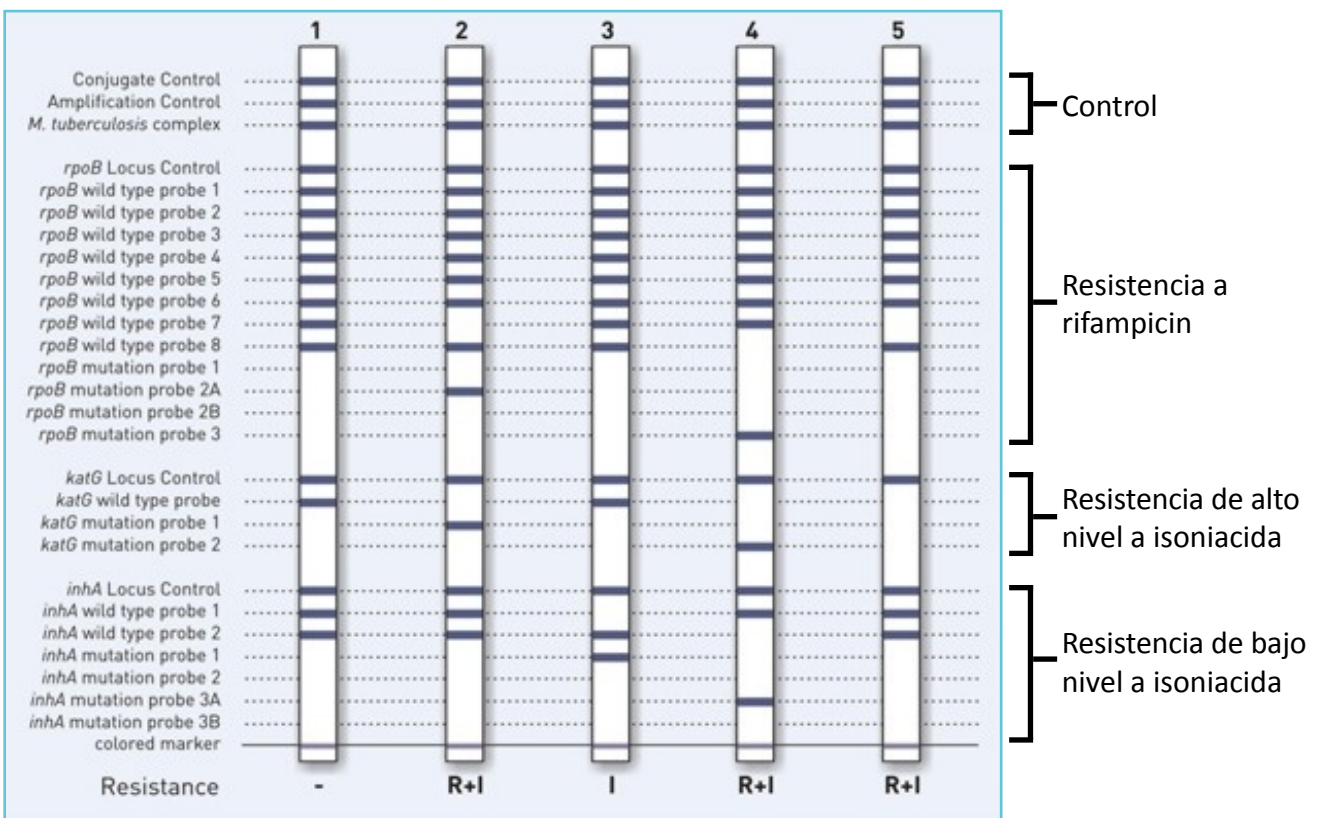
Pruebas comerciales para la susceptibilidad a drogas (DST) en cultivos líquidos

El sistema comercial de DST más comúnmente usado en cultivo líquido es el BACTEC MGIT 960 system con el kit BACTEC MGIT 960 SIRE

(Becton Dickinson, Franklin Lakes, New Jersey, USA). Este es un método indirecto para probar la susceptibilidad frente a antibióticos de primera línea (isoniacida, rifampicina, etambutol y pirazinamida). El test se hace con cultivos positivos del complejo *M. tuberculosis* inoculados en medios líquidos con las drogas y sin ellas y los resultados de susceptibilidad pueden reportarse en 1 a 2 semanas después de la inoculación. El método ha demostrado ser equivalente al método estándar de proporciones y ha sido aprobado por la FDA y promovido por la OMS. Otros sistemas automatizados de DST de *M. tuberculosis* que usan medio de

cultivo líquido incluyen el sistema Bact/ALERT MB (bioMérieux Inc., Durham, North Carolina, USA) y el VersaTREK system (Trek Diagnostic Systems, West Lake, Ohio, USA). El uso de estos sistemas comerciales, en los que se inoculan en medios de cultivo con drogas las especímenes de pacientes que fueron positivos en el frotis, potencialmente reduciría el tiempo en el que se reportan los resultados de DST en 1 - 3 semanas. Sin embargo, las “pruebas directas de susceptibilidad” de los especímenes clínicos es problemática, debido al potencial de tener bacterias contaminantes y otras especies no-tuberculosas, lo que resulta en que estos tests

Figura 5 Un ejemplo de un “reverse line blot assay”, el Genotype MTBDRplus strip



Se muestran los resultados de DST de 5 cepas del complejo *M. tuberculosis*. (1) cepa susceptible; (2) cepa resistente a rifampicina y con alto nivel de resistencia a la isoniacida; (3) cepa sensible a rifampicina y bajo nivel de resistencia a isoniacida; (4) cepa resistente a rifampicina y un alto y bajo nivel de resistencia para isoniacida; (5) cepa resistente a rifampicina y con alto nivel de resistencia a isoniacida. La tira contiene 27 bandas: 21 son para detectar mutaciones en regiones de genes asociados con resistencia (11 bandas detectan el loci del tipo salvaje y 10 bandas detectan el loci de resistencia a antibióticos). Seis bandas en la tira son bandas controles: control del conjugado, control de amplificación, control del complejo *M. tuberculosis* y los controles de amplificación del loci de los genes *rpoB*, *katG* y *inhA*.

pueden fallar hasta en un 15%. Por esta razón, la mayoría de laboratorios confían en los métodos indirectos, usando un aislamiento primario, para las pruebas de susceptibilidad.

Métodos moleculares rápidos para TSD

Mucho esfuerzo ha convocado la investigación en describir las mutaciones presentes en aquellos genes de *M. tuberculosis*, asociados con la resistencia a las drogas anti-TB. Este conocimiento ha posibilitado el desarrollo de ensayos rápidos basados en el ADN también llamados, “molecular line probe assays”, que permiten la detección simultánea del complejo *M. tuberculosis* y de las mutaciones asociadas con la resistencia a rifampicina (sola o en combinación con isoniacida). Estos ensayos se basan en el PCR, y pueden ser usados directamente con especímenes clínicos, dando resultados dentro de 24 a 48 horas; una mejora considerable en comparación al tiempo que requiere un convencional TSD, que es generalmente de 1 a 2 meses. A partir de un cultivo o una muestra clínica, positiva para *M. tuberculosis*, se amplifica por PCR la región del gen asociada a resistencia, seguido por un segundo ensayo para determinar si esta secuencia contiene mutaciones relacionadas a esa resistencia. Esto se realiza con ensayos de hibridización. Los productos de PCR marcados son hibridizados con sondas de oligonucleótidos inmovilizadas en tiras de nitrocelulosa. Las mutaciones se detectan por falta de unión a las sondas de las cepas salvajes o por unión a sondas específicas para mutaciones que ocurren comúnmente (Figura 5).

Actualmente, dos ensayos comerciales de este tipo existen, el INNO-LiPA1 Rif.TB (Innogenetics, Ghent, Belgium) y el GenoType MTBDRplus® (Hain LifeScience GmbH, Nehren, Germany). El LiPA detecta simultáneamente el complejo *M. tuberculosis* y la resistencia a la rifampicina. El GenoType MTBDRplus® detecta resistencia a rifampicina así como altos y bajos niveles de

resistencia a isoniacida (Figura 5). En ambos tests, la identificación de resistencia a la rifampicina se da por la detección de mutaciones significantes en el gen *rpoB* (que codifica para la subunidad β de la ARN polimerasa). Para evaluar la alta resistencia a la isoniacida, el gen *katG* (que codifica para la catalasa peroxidasa) es examinado y para el bajo nivel de resistencia, se analiza la región del promotor del gen *inhA* (que codifica para la NADH enoyl ACP reductasa). Recientemente, el GenoType MTBDRs/ se ha diseñado para evaluar la resistencia a drogas anti-TB de segunda línea (fluoroquinolonas, etambutol, aminoglicósidos y péptidos cíclicos). Este test puede ser usado en combinación con el MTBDRplus para identificar TB-ER.

La OMS ha recomendado el uso del INNO-LiPA1 Rif.TB y del GenoType MTBDRplus® LiPA para el diagnóstico rápido de TB-MR en sitios con niveles altos de TB-MR. Varios estudios evalúan y demuestran que los “Line Probe Assays”, son altamente exactos en detectar TB-MR en una variedad de lugares y que son costo-efectivos cuando se comparan con el cultivo de TB y los métodos convencionales de DST (31-33).

CONCLUSIONES Y DISCUSIÓN

En las décadas pasadas, varios métodos moleculares han sido desarrollados para la detección, identificación de especies, y la evaluación rápida de la susceptibilidad a drogas de las micobacterias. Estos métodos reducen el tiempo de diagnóstico de la TB de semanas a días. Algunas técnicas son simples, pero otras son demandantes e incrementan el costo del diagnóstico considerablemente. Algunos de estos nuevos métodos, han sido recomendados por la OMS y han mostrado su potencial para mejorar significativamente la detección de casos y el manejo de pacientes, inclusive los casos de TB resistente a drogas (34,35). Sin embargo, para la mayoría de países de bajos recursos,

con altas tasas de TB, donde esta tecnología es más necesaria, es prácticamente imposible que puedan acceder a la compleja infraestructura técnica que está nueva metodología requiere. De acuerdo a reportes de la OMS, el ochenta por ciento de todos los casos mundiales ocurren en 22 países altamente poblados, la mayoría de ellos, de bajos recursos. En gran parte de estos países, el diagnóstico de TB se hace en base a la microscopía solamente, sumado a que muchos laboratorios son marginalizados por los programas de control de TB, sin personal entrenado, equipo adecuado y sin mantenimiento. Programas de aseguramiento de la calidad, ni tampoco controles externos para algunos de estos laboratorios están presentes (36). Es prioridad para estos países el mejoramiento del sistema nacional de laboratorios, para proveerlos de microscopios de alta calidad y que accedan al cultivo convencional y a los tests de susceptibilidad a drogas.

Es importante puntualizar que la nueva tecnología no puede reemplazar a los métodos estándares de diagnóstico: cultivo y el tradicional DST. El cultivo es todavía necesario para el diagnóstico de TB en pacientes con frotis negativo y el DST convencional se requiere para confirmar la resistencia detectada molecularmente. La detección molecular de la resistencia depende de la resistencia conferida por alguna mutación. Sin embargo, mecanismos alternativos de resistencia podrían desarrollarse o podrían aparecer mutaciones que no serían detectadas por el test. Para proveer resultados rápidos y confiables para el diagnóstico de TB y cuidado del paciente, se necesita de una combinación de pruebas que incluyan tinción de frotis usando microscopio de fluorescencia, métodos con medios de cultivo sólidos y líquidos, y ensayos moleculares para la identificación de TB y la detección de resistencia a drogas. Desde luego, que la implementación de todas estas herramientas en laboratorios

de rutina requiere también de sistemas apropiados de aseguramiento de la calidad.

Algunos de los principales problemas en el diagnóstico de TB no han sido resueltos con nuevas técnicas de diagnóstico. Existe todavía la necesidad de incrementar la sensibilidad en la detección de TB entre los pacientes con TB extra-pulmonar o enfermedad paucibacilar, entre pacientes inmunocomprometidos (VIH) y niños. Se requiere también de un ensayo simple y de bajo costo para usarse en centros de atención primaria, donde acuden la mayoría de pacientes con TB, pero en los que no se puede muchas veces tener acceso a un diagnóstico de la enfermedad confirmado por el laboratorio (37). Para tener un impacto en el problema de la TB en estos sitios de recursos limitados, el diagnóstico ideal sería un test sensible, específico, económicamente accesible y de realización en el punto de atención a pacientes. El progreso hacia un test de este tipo ha sido limitado, pero tal vez en un futuro cercano el descubrimiento de nuevos biomarcadores que puedan ser medidos en el sitio de atención, hará posible un diagnóstico exacto de TB con un simple test en tiempo-real. Varias pruebas para TB en el punto de atención, incluyendo ensayos serológicos mejorados, aditamentos moleculares manuales, ensayos basados en la respiración para la detección de compuestos orgánicos volátiles en el paciente enfermo, tecnologías con microchips y tests basados en proteómica y metabolómica, están bajo investigación (34, 37). A medida que la tecnología avanza, nuevas pruebas para TB y TB resistente estarán disponibles en el mercado y cuando la competencia aumente, sus precios deberían reducirse significativamente, haciéndolas accesibles para países donde los recursos son limitados y el presupuesto para la salud está lejos de ser el ideal.

BIBLIOGRAFÍA

1. WHO. Global tuberculosis report 2014. Geneva: World Health Organization, 2014. http://www.who.int/tb/publications/global_report/en/ (accessed Sept 12, 2015).
2. Marais BJ, Brittle W, Painczyk K, Hesselning AC, Beyers N, et al. Use of light-emitting diode fluorescence microscopy to detect acid-fast bacilli in sputum. *Clin Infect Dis* 2008;47: 203–207.
3. Hanscheid T The future looks bright: low-cost fluorescent microscopes for detection of *Mycobacterium tuberculosis* and *Coccidia*. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2008;102: 520–521
4. Somoskövi A, Ködmön C, Lantos A, Bártfai Z, Tamási L, Fűzy J, Magyar P. Comparison of recoveries of mycobacterium tuberculosis using the automated BACTEC MGIT 960 system, the BACTEC 460 TB system, and Löwenstein-Jensen medium. *J Clin Microbiol.* 2000;38(6):2395-2397.
5. Heifets L, Linder T, Sanchez T, Spencer D, Brennan J. Two liquid medium systems, mycobacteria growth indicator tube and MB redox tube, for *Mycobacterium tuberculosis* isolation from sputum specimens. *J Clin Microbiol.* 2000;38(3):1227-1230.
6. Williams-Bouyer N, Yorke R, Lee HI, Woods GL. Comparison of the BACTEC MGIT 960 and ESP culture system II for growth and detection of mycobacteria. *J Clin Microbiol.* 2000;38(11):4167-4170.
7. Piersimoni C, Scarparo C, Callegaro A, Tosi CP, Nista D, Bornigia S, Scagnelli M, Rigon A, Ruggiero G, Goglio A. Comparison of MB/Bact alert 3D system with radiometric BACTEC system and Löwenstein-Jensen medium for recovery and identification of mycobacteria from clinical specimens: a multicenter study. *J Clin Microbiol.* 2001;39(2):651-657.
8. Update: Nucleic acid amplification tests for tuberculosis. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.*2000;49:593–594.
9. Ling DI, Flores LL, Riley LW, Pai M. Commercial nucleic acid amplification tests for diagnosis of pulmonary tuberculosis in respiratory specimens: meta-analysis and meta-regression. *PLoS One.* 2008;3(2):e1536.
10. The use of a commercial loop-mediated isothermal amplification assay (TB-LAMP) for the detection of tuberculosis. 2013. WHO/HTM/TB/2013.05. Geneva. Retrieved from: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/83142/1/WHO_HTM_TB_2013.05_eng.pdf.
11. Cepheid GeneExpert Systems. <http://www.cepheid.com/us/cepheid-solutions/systems/genexpert-systems/genexpert-i>.
12. Steingart KR, Schiller I, Horne DJ, Pai M, Boehme CC, Dendukuri N. Xpert® MTB/RIF assay for pulmonary tuberculosis and rifampicin resistance in adults. *Cochrane Database Syst Rev.* 2014; 21;1- 161.
13. World Health Organization. TB diagnostics and laboratory strengthening. Retrieved from: <http://who.int/tb/laboratory/mtbrifrollout/en/>.
14. Steingart KR, Flores LL, Dendukuri N, et al. Commercial serological tests for the diagnosis of active pulmonary and extra-pulmonary tuberculosis: an updated systematic review and meta-analysis. *PLoS Med* 2011; 8: e1001062.
15. World Health Organization. Commercial serodiagnostic tests for diagnosis of tuberculosis: policy statement. WHO/HTM/TB/2011.5. Geneva, Switzerland: WHO, 2011.
16. Wang L, Turner MO, Elwood RK, Schulzer M, FitzGerald JM A meta-analysis of the effect of Bacille Calmette Guerin vaccination on tuberculin skin test measurements. *Thorax* 2002; 57: 804-809.
17. Farhat M, Greenaway C, Pai M, Menzies D False-positive tuberculin skin tests: what is the absolute effect of BCG and non-tuberculous mycobacteria? *Int J Tuberc Lung Dis* 2006;10: 1192-1204
18. Centers for Disease Control and Prevention. Updated Guidelines for Using Interferon Gamma Release Assays to Detect *Mycobacterium tuberculosis* Infection, United States, 2010. *MMWR* 2010;59(1-25)
19. Prevots DR, Marras TK. Epidemiology of human pulmonary infection with nontuberculous mycobacteria: a review. *Clin Chest Med.* 2015;36(1):13-34.
20. Telenti A, Marchesi F, Balz M, Bally F, Böttger EC, Bodmer T. Rapid identification of mycobacteria to the species level by polymerase chain reaction and restriction enzyme analysis. *J Clin Microbiol.* 1993;31(2):175-178.
21. Kirschner P, Springer B, Vogel U, et al. Genotypic identification of mycobacteria by nucleic acid sequence determination: report of a 2-year experience in a clinical laboratory. *J Clin Microbiol.* 1993;31(11):2882-2889.
22. Brent AJ, Mugo D, Musyimi R, Mutiso A, Morpeth S, Levin M, Scott JA. Performance of the MGIT TBc identification test and meta-analysis of MPT64 assays for identification of the *Mycobacterium tuberculosis* complex in liquid culture. *J Clin Microbiol.* 2011;49(12):4343-4346.
23. Palomino JC, Vandamme P, Martin A. Classical and new assays for detecting drug resistance in tuberculosis. *Biomark Med.* 2014;8(9):1105-1114.
24. Palomino JC. Molecular detection, identification and drug resistance detection in *Mycobacterium tuberculosis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009;56(2):103-111.
25. Minion J, Leung E, Menzies D, Pai M. Microscopic-observation drug susceptibility and thin layer agar assays for the detection of drug resistant tuberculosis: a systematic review and meta-analysis. *Lancet Infect Dis.* 2010;10(10):688-698.

26. Martin A, Panaiotov S, Portaels F, Hoffner S, Palomino JC, Angeby K. The nitrate reductase assay for the rapid detection of isoniazid and rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2008;62(1): 56-64.
27. Martin A, Portaels F, Palomino JC. Colorimetric redox-indicator methods for the rapid detection of multidrug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *J Antimicrob Chemother.* 2007; 59(2):175-183.
28. Montoro E, Lemus D, Echemendia M, Martin A, Portaels F, Palomino JC. Comparative evaluation of the nitrate reduction assay, the MTT test, and the resazurin microtitre assay for drug susceptibility testing of clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *J Antimicrob Chemother.* 2005;55(4):500-505
29. Morgan M, Kalantri S, Flores L, Pai M. A commercial line probe assay for the rapid detection of rifampicin resistance in *Mycobacterium tuberculosis*: a systematic review and meta-analysis. *BMC Infect Dis* 2005; 5: 1-9
30. Ling D, Zwerling A, Pai M. GenoType MTBDR assays for the diagnosis of multidrug-resistant tuberculosis: a meta-analysis, *Eur Respir J.* 2008; 32: 1165–1174
31. Ling DI, Zwerling AA, Pai M. Rapid diagnosis of drug-resistant TB using line probe assays: from evidence to policy, *Expert Review of Respiratory Medicine* 2008;2(5):583-588.
32. Boehme CC, Saacks S, O'Brien RJ. The changing landscape of diagnostic services for tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2013;34(1):17-31
33. Parrish NM, Carroll KC. Role of the clinical mycobacteriology laboratory in diagnosis and management of tuberculosis in low-prevalence settings. *J Clin Microbiol.* 2011;49(3):772-776.
34. Parsons LM, Somoskövi A, Gutierrez C, Lee E, Paramasivan CN, Abimiku A, Spector S, Roscigno G, Nkengasong J. Laboratory diagnosis of tuberculosis in resource-poor countries: challenges and opportunities. *Clin Microbiol Rev.* 2011;24(2):314-350.
35. McNerney R, Maeurer M, Abubakar I, et al. Tuberculosis diagnostics and biomarkers: needs, challenges, recent advances, and opportunities. *J Infect Dis.* 2012;15;205 Suppl. 2:S147-58.

Neonatal screening - its importance and impact in Latin America

Graciela Queiruga

Laboratory of the Social Security Bank, Montevideo, Uruguay

ARTICLE INFO

Corresponding author:

Graciela Queiruga, PhD
Former Director
Laboratory of Neonatal Screening of Uruguay
Laboratory of the Social Security Bank
Montevideo, Uruguay
E-mail: eggbm@adinet.com.uy

Key words:

neonatal screening, congenital hypothyroidism, methodologies for neonatal screening

Acknowledgments:

We thank the following people who have sent the information included in this article through the questionnaire answered in August 2015.
Brasil: Dra. Ana Stella Goldbeck
Costa Rica: Drs. Sergio Obando, Mildred Jiménez and Rafael Trejos
Mexico: Dra. Isabel Ibarra
Dominican Republic:
Dra. Ceila Pérez de Ferrán

ABSTRACT

Global research on neonatal screening began in 1962 when Dr. Robert Guthrie¹ discovered the disease at birth and with its subsequent treatment prevented irreparable consequences; he obtained the blood sample from the heel, which has proved to be harmless, safe and easy to execute. However, it was not until the 1990's, when some Latin American countries began their programs and research on neonatal screening. Uruguay was quick in obtaining a wide coverage, this was probably due to the small number of child births or the already available health organizational infrastructure. This is a report about the development of neonatal screening programs based on the disease prevalence and methodologies used in Latin American countries.

BACKGROUND

The neonatal research program began in Uruguay following an increase in the incidence of congenital hypothyroidism (HC) in 1990. Since 1994, screening for the condition is mandatory by examination of thyroid stimulating hormone (TSH) in cord blood. At that time, VDRL examination to detect congenital syphilis was compulsory as per the national Decree 183/94. In 2007, due to comprehensive reforms of the integrated national health system (SNIS) as dictated by the national decree 416/07, screening for phenylketonuria (PKU), by testing for phenylalanine, and congenital adrenal hyperplasia (HSC) by testing for 17-OH-Progesterone, was made compulsory. Subsequently, in 2009, following successful lobbying by the Society of parents of children with Cystic Fibrosis (CF), the national Decrees 677/09 made research on CF and screening for hearing defects mandatory. In 2011, following another national decree, acetyl CoA of medium-chain (MCAD) deficiency was also examined as part of the mandatory screening. The Ministry of Public Health Laboratory of the Bank of Social Security (BPS) was then the reference laboratory and the only laboratory responsible for Neonatal screening in the country. In 2013, the study of Hemoglobinopathies began using high-resolution liquid chromatography technique (HPLC) and a large number of carriers of mutations of the globin chains and sick children were identified.^{2,3,4,5,6,7}

In Costa Rica the newborn screening program started by examining congenital hypothyroidism and phenylketonuria (PKU) in 1991, the program now screens for 29 conditions. In 2007, 98% of newborns were screened, this improved slightly (98.3%) by 2014.

In Mexico, Dr. Antonio Velázquez after completing his training in PKU with Dr. Guthrie in 1974, initiated the implementation of a national program.

But it took till 1988 for the mandatory screening of HC to become a national standard.^{8,9,10,11}

In Brazil, Dr. Benjamin Smith initiated research on PKU and HC in 1976 in the private sector. The initiative was supported by different philanthropic organizations and those dealing with disabled children. Eventually a federal law in 2001 gave the legal background for setting up the newborn screening program on a national level.

The Dominican Republic commenced its national neonatal screening program as recently as 2014.

MATERIAL AND METHODS

In Uruguay, the blood sample for the newborn screening program is collected from the heel. The sampling is done 40 hours after birth and the samples are analyzed at a centralized laboratory. The number of newborns in Uruguay is less than 50 000 annually, and more that 90% of the newborns are discharged within 48 hours. Sampling as such is done prior to discharge and this ensure a nearly 100% coverage. Sampling and documentation is the task of the staff at the maternity ward. The blood sample is allowed to dry for 4 hours before being mailed by certified post.

The following are techniques most used in the programs of Neonatal screening in Uruguay, Costa Rica, Mexico, Brazil and the Dominican Republic.

In Uruguay, the most common methods used are:

- Stimulating Thyroid Hormone (TSH): Currently serum samples are processed using a Roche Elecsys; blood samples are taken in a filter paper using the Bio Rad technique, but in the near future this will be done with Autodelfia.
- Phenylalanine: Since 2008, mass spectrometry is used for the test of phenylalanine and tyrosine.

- 17-OH-Progesterone: It is quantified by the Bio Rad ELISA method.
- Trypsin Immunoreactive: Currently, the Neonatal AutoDelfia Fluoroimmunoassay of Perkin Elmer is being used. Results that are above the cutoff point of 65 ng/mL are thought to be due to pancreatitis (PAP). For a confirmatory method the sweat test is done by the method of Clark Collip.
- Acetyl CoA Dehydrogenase chain Media (MCADD) deficiency: Acylcarnitine C8/C2, C8, C10, C6 is measured by spectrometry of atomic absorption by a 3000 API; confirmation is done by dosing the organic acids in

urine by GC mass with an instrument from Agilent.

In Costa Rica, the methods mostly used are: mass-spectrometry, HPLC, immunofluorometry, fluorimetry. For confirmatory studies they use GC mass spectrometry and genome sequencing. The health care system supports and has established protocols for treatment of detected cases.

In Mexico, the methodologies employed primarily are: ELISA, absorption spectra and iso-electrofocusing.

In Brazil, these same methodologies are used, and in some states they are complemented by mass spectrometry.

Table 1 Number of positive cases of neonatal screening in Uruguay from 2009 to 2013

Diagnosis	Number of cases
Congenital Hypothyroidism [CH]	78
Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH)	29
Cystic Fibrosis (CF)	29
Classic phenylketonuria (PKU)	13
Hyperphenylalaninaemia (HPA)	12
Medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency (MCAD)	5
Methylmalonic acidemia (methylmalonyl-CoA mutase, MUT)	2
Hemoglobinopathies (Hbp)	5
BH4 deficiency	1
Citrullinemia, type I (CIT)	1
3-Methylcrotonyl-CoA carboxylase deficiency (3-MCC)	1
Maternal B12 deficiency	4
Cobalamine Deficiency (CblCD)	1
Carnitine Deficiency (CUD)	1

RESULTS

Results from Uruguay between 2009 and 2013 are shown in Table 1.

The techniques used to investigate and confirm the diagnoses by the Neonatal screening laboratory testing in Uruguay are shown in Table 2, while those used in Costa Rica are illustrated in Table 3.

In Mexico, Marcela Vela-Amieva's¹⁰ group reported great variability of diseases that are included in the screening programs, it ranges from 1 up to 60 diseases. Additionally they also report a great variation in the methodology. This is due to the difference in protocols used by each health care institution, e.g., the Secretariat

of health and assistance (SSA) only studies HC; HC and PKU are studied at the Mexican Social Security Institute (IMSS) and in some other clinics HSC is also diagnosed in addition; HC and PKU is done in some clinics at the Institute of security and social services for State employees (ISSSTE); in others, such as Petróleos Mexicanos (PEMEX) tests are conducted mainly to diagnose HC, Cystic Fibrosis, PKU, hemoglobinopathies, defects in the beta oxidation, galactosemia, the organic acidemias, and toxoplasmosis.

In Brazil, the following diseases are diagnosed in children: HC, PKU, Hb (SCD), CF, HSC, and biotinidase deficiency. These programs also comprise of detection and treatment of children who are carriers of the disease. It is important to note

Table 2 Neonatal screening panel in Uruguay

Disease	Metabolite	Screening technique	Verification	Verification technique
CH	TSH	Fluoroimmunometric in whole blood in paper, ECLIA in serum	T4	ECLIA
PKU	Phenylalanine	Mass	Tyrosine, F/T	Mass
CAH	17-OHP	Fluoroimmunometric	Na, K, cortisol, aldosterone	Ion selective electrode. Other derivated hormones
CF	TIR, PAP	Fluoroimmunometric ELISA	Sweat test	Clark Collin Method, dosifying Cl
Hemoglobinopathies	Hb A, A2, F, C, S	HPLC	BC and IEF	Isoelectro-focusing
Amino-acidopathies	AmAc	Mass	Aminoacids	HPLC
Organic acidemias	Related Carnitines	Mass	Organic acids	MGC
BH4 deficiency disorders	Related Carnitines	Mass	Organic acids	MGC

Table 3 Screening panel in Costa Rica

Endocrinopathies	CH, CAH
Aminoacidopathies	Galactosemia, PKU, MSUD, Citrullinemia, Argininemia, Homocystinuria, Tyrosinemia
Beta oxidation disorders	short chain SCAD, MCAD medium, long VLAD, Multiple dehydrogenase deficiency (GTII), Carnitine, palmitoyl transferase deficiency (GPTII)
Organic acidemias	Isovaleric acidemia (IVA), Propionic Acid (PA), Methylmalonic Acid (AM), Hydroxymethylglutaryl CoA lyase deficiency (HMG), Methylcrotonyl CoA carboxylase deficiency (MCC), Glutaric acidemia type I (GAI), Beta ketothiolase deficiency (BKT), Multiple carboxylase deficiency (MCD)
Cystic Fibrosis	alpha-thalassemias, Beta-thalassemia (Hb S/βTh), Hb C, Hb S, Hb E, Hb D

that in 2013, the total number of children studied were 2.463.518, i.e, 84.9% of the newborns. In the Dominican Republic, research programs will begin this year, and they include the following diagnoses HC, GAL, PKU, Hbs, G6DPD.

CONCLUSIONS

Several countries have implemented public child protection policies and promote programs for prevention of childhood diseases; Uruguay is a good example, being a country of low birth rate (about 48 000 births/year) where every child is a valuable capital for the country's future. All Latin American countries have followed suit and have introduced newborn screening programs. The utility of the program can be measured in terms of disease prevention and treatment, and the reduction in the burden to the social and health care system.

REFERENCES

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963; 32: 338-343.

2. Queiruga G. Detección sistemática de hipotiroidismo congénito a todos los recién nacidos de Uruguay. *Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay*. 1994; 11: 7-11.

3. Queiruga G, Lemes A, Ferolla C, Machado M, Queijo C, Machado P, Parallada G. *Pesquisa-Neonatal: lo que puede prevenir una gota de sangre*. Montevideo, Uruguay, Editorial Centro de Estudios en Seguridad Social, Salud y Administración, 2010. ISBN: 978277-0-7

4. Queiruga G, Machado M, Lemes B, Lombardo R, Pacheco A, Soria A, et al. Congenital hypothyroidism: 18 years of program in Uruguay. *Revista de Investigación Clínica* 2009; 61(supl.1):79.

5. Garlo P, Machado M, Queijo C, Corbo L, Franca F, González F, Lemes A, Queiruga G. 17-hydroxyprogesterone (17-OHP)cut off evaluation for the congenital adrenal hyperplasia screening. *Revista de Investigación Clínica* 2009; 61(supl.1): 81.

6. Queijo C, Machado M., Franca F, Corbo L, González F, Lemes A, Queiruga G. Pilot Programme for newborn screening using mass spectrometry in Uruguay. *Revista de Investigación Clínica* 2009;61(supl. 1): 90.

7. Queijo C, Lemes A, Machado M, Garlo P, González F, Franca K, et al. Newborn screening of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Uruguay. *Acta Bioquím Clín Latinoam* 2011;45: 87-93.

8. Velázquez A, Villareal M, Galindo M. Newborn genetic screening: The Mexican program. En: Armendares S, Lisker R, Ebling F, Henderson I, editores. *Human genetics*. Amsterdam: Excerpta Médica; 1977. p. 214-224.

9. Norma Técnica 321 para la Prevención del Retraso Mental producido por Hipotiroidismo Congénito. México: Diario Oficial de la Federación, Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo CDXX; 1988. p. 89-90.

10. Variabilidad interinstitucional del Tamiz neonatal en México, Marcela Vela-Amieva et al. Bol Med Hosp

Infant Mex 2009;66:431-439 www.medigraphic.org.mx 2015.08.20

11. Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002. Para la prevención y control de los defectos al nacimiento. México: Diario Oficial de la Federación, Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo DLXXVII, 24; 2003.

Pesquisa neonatal - porque es importante hacerla y su impacto en América Latina

Graciela Queiruga

Laboratorio del Banco de Previsión Social, Montevideo, Uruguay

INFORMACIÓN SOBRE EL ARTÍCULO

Autor correspondiente:

Dra Graciela Queiruga
Directora exoficio del Laboratorio de
Pesquisa Neonatal del Uruguay
Laboratorio del Banco de Previsión Social
Montevideo, Uruguay
Correo electrónico: egqbm@adinet.com.uy

Palabras clave:

pesquisa neonatal, hipotiroidismo congénito,
metodologías para pesquisa neonatal

Agradecimientos:

Agradecemos a las siguientes personas
el que nos hayan enviado la información
que se incluye en este trabajo a través del
cuestionario contestado en agosto de 2015.

Brasil: Dra. Ana Stella Goldbeck

Costa Rica: Drs. Sergio Obando,
Mildred Jiménez, y Rafael Trejos

México: Dra. Isabel Ibarra

República Dominicana:

Dra. Ceila Pérez de Ferrán

RESÚMEN

La Pesquisa a nivel mundial comienza en el año 1962 con la magnífica idea del Dr. Robert Guthrie¹ de detectar la enfermedad al nacer y tratarla evitando un daño irreparable, así como la muestra de sangre de talón, inofensiva, segura, fácil de obtener y de transportar. Sin embargo, no es sino hasta la década de los años 90, que algunos países de América Latina comenzaron sus programas de Pesquisa, donde alguno de ellos, rápidamente alcanzaron una cobertura amplia, ya fuese por un menor número de nacimientos de los niños o por su organización sanitaria ya existente. En este reporte se informa del desarrollo de los programas en base a las enfermedades y metodologías utilizadas en algunos países de América Latina.

ANTECEDENTES

La Pesquisa Neonatal se inicia en el Uruguay a raíz del incremento por Hipotiroidismo Congénito (HC) en el año 1990, estableciéndose de manera obligatoria la detección de esta enfermedad mediante el estudio de la Hormona Tiroideo Estimulante (TSH) en sangre de cordón en 1994, ya que era obligatorio en el país el estudio de VDRL en esa muestra, para detectar sífilis congénita, Decreto 183/94. Para el año 2007, y debido a profundas reformas del Sistema Nacional Integrado de Salud (SNIS), se logra también ampliar la pesquisa a dos enfermedades más, la obligatoriedad del estudio de fenilalanina para detectar Fenilcetonuria (PKU) y 17-OHProgesterona para detectar Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC). Decreto 416/07. Posteriormente, y en el año 2009, a solicitud de la Asociación Honoraria de Padres de niños portadores de Fibrosis Quística (FQ) se comenzó la pesquisa de esta enfermedad y así mismo la pesquisa de los defectos de la audición se hizo obligatoria, decretos 677/09 y 389/09. En 2011 la pesquisa del déficit de acetil CoA de cadena media (MCAD) se decreta obligatoria y el Ministerio de Salud Pública autoriza al Laboratorio del Banco de Previsión Social (BPS) como laboratorio de Referencia para Pesquisa Neonatal, único responsable. En el año 2013 se inicia el estudio de las Hemoglobinopatías mediante la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) hallándose gran número de portadores de mutaciones de las cadenas globinas y niños enfermos.^{2,3,4,5,6,7}

En Costa Rica, de manera similar y desde 1990 se inicia su programa diagnosticando el Hipotiroidismo Congénito y la Fenil Cetonuria (PKU por sus siglas en ingles), extendiéndose a la detección de 29 enfermedades más rápidamente. Y desde el año 2007 han alcanzado y mantenido una cobertura del 98% de los nacidos, llegando a ser en el 2014 del 98,3%.

En México, en el año 1974, el Dr. Antonio Velázquez realiza su entrenamiento con el Dr. Guthrie para aprender la pesquisa de PKU, e intenta implementar un programa nacional, pero no es sino hasta 1988 cuando se emite por primera vez la norma técnica Mexicana que contempla como obligatoria la pesquisa del HC.^{8,9,10,11}

En el Brasil, el Dr. Benjamin Smith en el año 1976, de manera similar a México, comienza la pesquisa de PKU e HC en el sector privado a través de las organizaciones para niños con capacidades diferentes y las organizaciones filantrópicas. En el año 2001 se promulga una ley federal y se expande el Programa Nacional de Triagem Neonatal.

En este año, 2014, en República Dominicana, se inicia el programa nacional de pesquisa neonatal, ya que actualmente solo se tamiza un 0,9% de la población en el sector privado y la pesquisa ampliada se envía a analizar en el extranjero.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el Uruguay, para el estudio de estas enfermedades se implementó la toma de muestra de sangre de talón a las 40 horas de nacidos y se centralizó en un solo laboratorio del país el procesamiento de las muestras. En el país, el número de los nacidos es menor a 50.000, y el número de partos institucionales mayor al 90% con el alta de las maternidades habitualmente posterior a las 48hs, por lo que la toma de la muestra antes del alta permitió una buena cobertura del programa cerca del 100% de los nacimientos. La toma de muestra estuvo bajo la responsabilidad del personal de la maternidad así como el documentar los datos del niño y de la madre. El procedimiento consiste en dejar secar la muestra por un tiempo no menor a 4 horas y ponerla en un sobre diseñado especialmente para depositarlo en el correo postal el cual transporta gratuitamente el sobre y certifica el envío.

A continuación se enumeran las técnicas más empleadas en los programas de Pesquisa Neonatal en el Uruguay, Costa Rica, México, Brasil y República Dominicana.

En el Uruguay, los métodos que se utilizan son:

- Hormona Tiroidea Estimulante (TSH). Actualmente las muestras de suero se procesan con el Elecsys de Roche y las muestras de sangre en papel de filtro por la técnica de Bio Rad, y por la técnica de Autodelfia próximamente.
- Fenilalanina. Desde 2008 se utiliza la Espectrometría de Masas para la prueba de Fenilalanina y la Tirosina, y se calcula la relación Fe/Tir, lo que da una mayor certeza en los resultados desde la primera muestra.
- 17-OHProgesterona. Se cuantifica por el Método Elisa de Biorad
- Tripsina Inmunoreactiva. Actualmente se utiliza el Fluoroimmunoensayo AutoDelfia Neonatal de Perkin Elmer. A los resultados que están por arriba del punto de corte de 65ng/mL se les realiza la proteína unida a la pancreatitis (PAP). Como método confirmatorio se hace la prueba del sudor por el método de Clark Collip y se dosifica Cloro.
- Déficit de Acetil CoA Deshidrogenasa de cadena Media (MCADD). Se dosifican las acilcarnitinas C8, C8/C2, C10, C6 por Espectrometría de Absorción Atómica en un API 3000 y la confirmación se hace dosificando los ácidos orgánicos elevados en orina por GC Masa Agilent.

Cuadro 1 Número de casos de pesquisa neonatal en el Uruguay de 2009 a 2013

Diagnostico	Número de casos
Hipotiroidismo congénito (HC)	78
Hiperplasia Suprarrenal Congénita (HSC)	29
Fibrosis Quística (FQ)	29
Fenilquetonuria (PKU)	13
Hiperfenilalaninemia (HFA)	12
Déficit de Acetil CoA Deshidrogenasa de cadena Media (MCADD)	5
Acidemia Metil Malónica (AMM)	2
Hemoglobinopatías (Hb SCD)	5
Deficiencia de BH4	1
Citrullinemia, type I (CIT)	1
Deficiencia de 3- metil Crotonil CoA carboxilasa (3-MCC)	1
Deficiencia de B12 materna	4
Deficiencia de Cobalamina C (DCbIC)	1
Deficiencia de Carnitina (CUD)	1

En Costa Rica, los métodos utilizados son: La Espectrometría de Masa, el HPLC, la Inmunofluorometría, fluorometría. Para estudios confirmatorios utilizan la GC Masa y secuenciación genómica. En su sistema de salud está protocolizado y financiado el tratamiento de los casos detectados.

En México, las metodologías empleadas principalmente son: Elisa, Delfia, Microelisa, Espectrometría de Absorción e Isoelectroenfoque.

En Brasil, estas mismas metodologías son utilizadas, y en algunos estados se realiza la pesquisa ampliada por Espectrometría de masas.

RESULTADOS

Los resultados del Uruguay se muestran a continuación en la Cuadro 1, donde y desde el 2009 y más recientemente en el 2013, se han detectado los siguientes casos en el Laboratorio de pesquisa neonatal:

Las técnicas utilizadas para estas pesquisas y diagnósticos confirmatorios en el Laboratorio de Pesquisa Neonatal de Uruguay son las que se muestran a continuación en la Cuadro 2.

En Costa Rica, se estudian las siguientes enfermedades, presentados en Cuadro 3:

En México, el grupo de Marcela Vela-Amieva 10 reportó una gran variabilidad entre las enfermedades que se tamizan que van desde 1 hasta

Cuadro 2 Técnicas utilizadas en Uruguay para la pesquisa neonatal

Enfermedad	Metabolito	Técnica pesquisa	Confirmatorio	Técnica de confirmación
HC	TSH	Fluoroimmunométrico en sangre entera en papel, ECLIA en suero	T4	ECLIA
PKU	Fenilalanina	Masa	Tirosina, F/T	Masa
HSC	17-OHP	Fluoroimmunométrico	Na, K, cortisol, aldosterone	Ion selective electrode. Other derivated hormones
CF	TIR, PAP	Fluoroimmunométrico ELISA	Test del sudor	Método de Clark Collin, dosificando Cl
Hemoglobino-patías	Hb A, A2, F, C, S	HPLC	Hemograma y IEF	Isoelectroenfoque
Aminoácido-patías	AmAc	Masa	Aminoácidos	HPLC
Acidemias orgánicas	Carnitinas y relaciones	Masa	Ácidos orgánicos	GC Masa
Defectos de la Beta oxidación	Carnitinas y relaciones	Masa	Ácidos orgánicos	GC Masa

Cuadro 3 Técnicas utilizadas en Costa Rica

Endocrinopatías:	HSC, HC
Aminoacidopatías	Galactosemia. PKU, MSUD, Citrulinemia, Argininemia, Hócistinuria, Tirosinemia
Defectos de la beta oxidación	De cadena corta SCAD, media MCAD, muy larga VLAD, deficiencia múltiple de deshidrogenasas (GTII), Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa (GPTII)
Acidemias orgánicas	Acidemia isovalérica (IVA), c. Propiónica (PA), Ac. Metilmalónica (AM), Def. de Hidroximetilglutaril CoA liasa (HMG), Def. de Metilcrotonil CoA carboxilasa (MCC), Acidemia Glutárica tipo I (GAI), Def. Beta Ketotilasa (BKT), Def. Múltiples carboxilasas (MCD), Variantes de las cadenas Beta globina: Hb C, Hb S, Hb E, Hb D, Beta Talasemia
Variantes de la cadena alfa globina	alfa Talasemias
Variantes de las cadenas Beta globina	Hb C, Hb S, Hb E, Hb D, Beta Talasemia
Fibrosis Quística	alfa Talasemias, β Beta Talasemia (Hb S/ β Th), Hb C, Hb S, Hb E, Hb D

60, así como gran variación en la metodología. Esta situación se debe a la diferencia de protocolos utilizados, por ej., en la Secretaria de Salud y Asistencia (SSA) solo se estudia el HC; en el Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) se estudian el HC, la PKU y en algunas clínicas también se diagnostica el HSC; en el Instituto de Seguridad y Servicios Sociales para los Trabajadores del Estado (ISSSTE) se hacen la HC y PKU en algunas clínicas; en otros más, como Petróleos Mexicanos (PEMEX) principalmente se realizan las pruebas para diagnosticar el HC, PKU, las Hemoglobinopatías, la Fibrosis Quística, los defectos de la Beta oxidación, la Galactosemia, las Acidemias orgánicas, la Toxoplasmosis.

En el Brasil, las siguientes enfermedades son diagnosticadas en los niños: HC, PKU, Hb (SCD),

FQ, HSC, Deficit de Biotinidasa. Estos programas también logran la detección y el tratamiento de los niños portadores de la enfermedad. Es importante considerar que en el 2013, los niños estudiados fueron 2.463.518, lo que comprende el 84,9% de los nacidos.

En República Dominicana, los programas de pesquisa incluirán los siguientes diagnósticos HC, GAL, PKU, Hbs, DG6PD, y comenzarán a partir de este año.

CONCLUSIONES

Varios países, a través de su historia se han caracterizado por desarrollar políticas públicas de protección a la infancia y promover programas de prevención de enfermedades infantiles, y en este caso el Uruguay, un país de baja natalidad

(aproximadamente 48000 nacimientos/año) cada niño constituye un capital valioso para el futuro del país. Los hallazgos encontrados en este país se repiten en toda la América Latina. Un día de no realizar la pesquisa puede ser un niño con retardo severo o la muerte. El costo de los programas no se fundamentan en la toma de la muestra y en hacer el examen, sino en el costo de tener un niño que no se pueda detectar a tiempo, lo que es equivalente al costo de un programa que no se realiza, lo que significa perder la oportunidad de identificar estos casos. Estamos construyendo hoy el futuro de esos niños detectados a tiempo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Guthrie R, Susi A. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*. 1963; 32: 338-343.
2. Queiruga G. Detección sistemática de hipotiroidismo congénito a todos los recién nacidos de Uruguay. *Revista de la Asociación de Química y Farmacia del Uruguay*. 1994; 9: 7-11.
3. Queiruga G, Lemes A, Ferolla C, Machado M, Queijo C, Machado P, Parallada G. *Pesquisa Neonatal: lo que puede prevenir una gota de sangre*. Montevideo, Uruguay, Editorial Centro de Estudios en Seguridad Social, Salud y Administración, 2010. ISBN: 978277-0-7.
4. Queiruga G, Machado M, Lemes B, Lombardo R, Pacheco A, Soria A, et al. Congenital hypothyroidism: 18 years of program in Uruguay. *Revista de Investigación Clínica* 2009; 61(supl.1):79.
5. Garlo P, Machado M, Queijo C, Corbo L, Franca F, González F, Lemes A, Queiruga G. 17-hydroxyprogesterone (17-OHP) cut off evaluation for the congenital adrenal hyperplasia screening. *Revista de Investigación Clínica* 2009; 61(supl.1): 81.
6. Queijo C, Machado M., Franca F, Corbo L, González F, Lemes A, Queiruga G. Pilot Programme for newborn screening using mass spectrometry in Uruguay. *Revista de Investigación Clínica* 2009;61(supl. 1): 90.
7. Queijo C, Lemes A, Machado M, Garlo P, González F, Franca K, et al. Newborn screening of medium-chain acyl-CoA dehydrogenase deficiency in Uruguay. *Acta Bioquím Clí Latinaam* 2011;45 (1): 87-93.
8. Velázquez A, Villareal M, Galindo M. Newborn genetic screening: The Mexican program. En: Armendares S, Lisker R, Ebling F, Henderson I, editores. *Human genetics*. Amsterdam: Excerpta Médica; 1977; 67: 214-224.
9. Norma Técnica 321 para la Prevención del Retraso Mental producido por Hipotiroidismo Congénito. México: Diario Oficial de la Federación, Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo CDXX; 1988. p. 89-90.
10. Variabilidad interinstitucional del Tamiz neonatal en México, Marcela Vela-Amieva et al. *Bol Med Hosp Infant Mex* 2009;66:431-439 www.medigraphic.org.mx 2015.08.20.
11. Norma Oficial Mexicana NOM-034-SSA2-2002. Para la prevención y control de los defectos al nacimiento. México: Diario Oficial de la Federación, Órgano del Gobierno Constitucional de los Estados Unidos Mexicanos, Tomo DLXXVII, 24; 2003.

Book review “Clinical Cases in Laboratory Medicine”

Joseph B. Lopez

MAHSA University, Kuala Lumpur, Malaysia

REVIEWED BOOK

“Clinical Cases in Laboratory Medicine”

by Jane French, Beverly Harris
and William Marshall

Publisher: ACB Venture Publications, Oct 2014

(a publication of the Association
of Clinical Biochemists, UK)

194 pages

ISBN 978-0-902429-56-7

EAN 9780902429567

Corresponding author:

Joseph B. Lopez

MAHSA University

Kuala Lumpur, Malaysia

RECESSION

Traditionally, the laboratory has produced results with reference intervals to guide interpretation. The pathophysiological interpretation has been mostly left to the attending doctor and there is no mandatory requirement for comments on results, even for the abnormal ones. Increasingly, however, the laboratories now append a comment to results when it is felt that this would help. This practice adds value to the result. While there is some evidence that comments have an impact on patient-care (1,2), there have been very few studies of its value and clearly more are required.

It is important that comments should reflect accepted practice and current knowledge and guidelines. Often, they do not. Indeed, there is a perception that there is much room for improvement as seen from the responses in QA programmes on result commentary. It has been of concern that a large proportion of comments seen in these QAPs were considered to be inappropriate and even misleading (3).

Therefore, “Clinical Cases in Laboratory Medicine” is a book whose time has come since there are hardly any books purely dedicated to the interpretative commentary of results in clinical chemistry. It contains

80 cases largely drawn from the UK NEQAS for Interpretative Comments. A list of reference intervals for the common analytes (intervals for the uncommon analytes are given where appropriate in the individual cases) and references for each scenario are provided in the appendices.

While many of the cases are straightforward, some of them have esoteric diagnoses. The format of the book consists of a short scenario for each case, followed by a set of laboratory data. This follows a question or questions designed to encourage the reader to consider the information from the perspective of the requesting clinician and then provide comment on the appropriate course of action to take. One of the authors has previously said that a good comment, should aim to answer the enquiring doctor's stated or implied question, indicate the possible significance of the results and perhaps suggest a response such as further investigation or referral (4).

While each case in the book begins on a fresh page, it is often much less than a page in length. This format has meant that a lot of space is wasted on the page containing the case description. The case commentary is given on the reverse page. Presumably this is to discourage the reader from falling to the temptation of reading the discussion before trying to figure it out. The commentary contains issues raised by the case together with options for further investigations and management of the patient and key learning points, all squeezed into a single page. The

need to cram the commentary into a single page has resulted in a smaller sized font being used to accommodate it into a single page. It would have been better if the same font size was used throughout the book and the commentary simply followed the case presentation without any waste of space.

This book is yet again another contribution from that excellent series of publications of the ACB. Besides the practising clinical biochemist, it will be useful to anyone involved with clinical biochemistry, including undergraduate or postgraduate students. While a wide range of cases is presented, almost all are based on clinical problems. However, unusual results can sometimes occur due to problems in the pre-analytical phase of testing. It is hoped that the authors will present in future editions scenarios that address problems in this important part of laboratory investigation.

REFERENCES

1. Kilpatrick ES. Can the addition of interpretative comments to laboratory reports influence outcome? An example involving patients taking thyroxine. *Ann Clin Biochem* 2004; 41: 227–229.
2. Bell DA, Bender R, Hooper AJ, McMahon J, et al. Impact of interpretative commenting on lipid profiles in people at high risk of familial hypercholesterolaemia. *Clin Chim Acta* 2013; 422: 21–25.
3. Lim EM, Sikaris KA, Gill J, Calleja J, et al. Quality Assessment of Interpretative Commenting in Clinical Chemistry. *Clin Chem* 2004; 50:3 632–637.
4. Marshall W. Read the Question Carefully Before You Write Your Answer! *ACB News Issue* 576. April 2011.



Editor-in-chief

Gábor L. Kovács

Institute of Laboratory Medicine, Faculty of Medicine, University of Pécs, Hungary

Assistant Editor

Harjit Pal Bhattoa

Department of Laboratory Medicine, University of Debrecen, Hungary

Editorial Board

Khosrow Adeli, The Hospital for Sick Children, University of Toronto, Canada

Borut Božič, University Medical Center, Ljubljana, Slovenia

Rajiv Erasmus, Dept. of Chemical Pathology, Tygerberg, South Africa

Nilda E. Fink, Universidad Nacional de La Plata, La Plata, Argentina

Mike Hallworth, Shrewsbury, United Kingdom

Ellis Jacobs, Alere Inc., New York, USA

Bruce Jordan, Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland

Evelyn Koay, National University, Singapore

Maria D. Pasic, Laboratory Medicine and Pathobiology, University of Toronto, Canada

Oliver Racz, University of Kosice, Slovakia

Rosa Sierra Amor, Laboratorio Laquims, Veracruz, Mexico

Sanja Stankovic, Institute of Medical Biochemistry, Clinical Center of Serbia, Belgrade, Serbia

Danyal Syed, Ryancenter, New York, USA

Grazyna Sypniewska, Collegium Medicum, NC University, Bydgoszcz, Poland

Istvan Vermes, University of Twente, The Netherlands

Peter Vervaart, LabMed Consulting, Australia

Stacy E. Walz, Arkansas State University, USA



Publisher: IFCC Communications and Publications Division (IFCC-CPD)

Copyright © 2015 IFCC. All rights reserved.

The eJIFCC is a member of the **Committee on Publication Ethics (COPE)**.

The eJIFCC (Journal of the International Federation of Clinical Chemistry) is an electronic journal with frequent updates on its home page. Our articles, debates, reviews and editorials are addressed to clinical laboratorians. Besides offering original scientific thought in our featured columns, we provide pointers to quality resources on the World Wide Web.

Contents may not be reproduced without the prior permission of the Communications and Publications Division (CPD) of the IFCC.

Produced by:



www.insoftdigital.com

Published by:



www.ifcc.org