ASVCP Qualitätssicherungs- und Laborstandard-Kommission

Qualitätskontroll-Richtlinien

Geschichtlicher Hintergrund

Die ASVCP Qualitätssicherungssicherungs- und Laborstandard-Kommission wurde im Jahre 1996 als Reaktion auf Bedenken von ASVCP-Mitgliedern bezüglich Qualitätssicherung und -kontrolle in Veterinärlabors gegründet. Qualitätssicherung und -kontrolle sind Themen von weitgehender Bedeutung, die zuvor bereits teilweise von anderen Kommissionen angesprochen worden waren.

Die Arbeitsgemeinschaft wurde damit beauftragt, die Festlegung von Standards für die Durchführung von Arbeitsabläufen in veterinärmedizinischen Labors zu ermutigen und zu fördern. Qualitätssicherung und Standards für veterinärmedizinische Labors ist ein weitreichendes Thema und eine große Aufgabe. Als eine Organisation von spezialisierten Labordiagnostikern und an Labordiagnostik interessierten Personen sind wir in der besonderen Position, um Leadership und Richtungsvorgaben für die klinische Labordiagnostik in der Veterinärmedizin anzubieten. Staatliche Regulierungen kontrollieren viele Aspekte humanmedizinischer klinischer Labore. Da eine derartige Regulierung für veterinärmedizinische Labors nicht existiert, sind wir verpflichtet aus unserer Disziplin heraus ein eigenständiges Engagement in diesen Bereichen zu zeigen und uns für eine Selbstüberwachung und Regulierung einzusetzen. Da wir eine Führungsrolle in unserem Spezialgebiet einnehmen, hoffen wir, damit die Qualität der veterinärmedizinischen Labordiagnostik zu erhöhen und die Gesundheit unserer veterinärmedizinischen Patienten zu verbessern.

Die hier aufgestellten Richtlinien sind nicht dazu gedacht, allumfassend zu sein. Im Gegenteil, es handelt sich um ein dynamisches Dokument, welches im Laufe der Zeit regelmäßig überprüft wird und zusätzlichen Überarbeitungen und Änderungen unterzogen werden wird. Voraussichtlich werden zukünftig weitere Themengebiete mit eingeschlossen. Bei den, bis zum jetzigen Zeitpunkt aufgenommenen Themen handelt es sich um solche, bei denen ein grundsätzlicher Bedarf festgestellt wurde, sowie und solche, die die Interessen und Fachkenntnisse einiger Labordiagnostiker dieser Kommission widerspiegeln. Um zukünftige Korrekturen einzelner Bereichen der Richtlinien und Hinzufügungen von neuen Themengebieten zu erleichtern, ohne das gesamte Dokument ändern zu müssen, wurde das gesamte Dokument in themenspezifische Abschnitte innerhalb der präanalytischen und analytischen Kapitel unterteilt (z.B. Hämatologie, Zytologie, Urinuntersuchung usw.).

Diese Richtlinien wurden einer gründlichen Überprüfung und Stellungnahme von Kommissions- und ASVCP-Mitgliedern unterzogen, um Informationen bereitzustellen, welche die Meinungen der Mitglieder der ASVCP widerspiegeln. Die ASVCP ist eine gemeinnützige wissenschaftliche Organisation, die sich der wissenschaftlichen Förderung, Training und Standards der veterinärmedizinischen Labormedizin widmet.

Zweck

Die vorliegenden Richtlinien bieten **Minimalrichtlinien für die Qualitätssicherung und -kontrolle** in der veterinärmedizinische Laborpraxis. Die verwendeten Begriffe beruhen auf Definitionen des „Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA)". Eine Richtlinie ist demnach ein Dokument, das basierend auf dem Konsens eingebrachter Kriterien entwickelt wurde, als Standardarbeitsanweisung genutzt werden kann und als Material zur freiwilligen Verwendung zur Verfügung steht. Eine Richtlinie kann vom Benutzer in der verfassten Form verwendet werden oder sie kann speziellen Bedürfnissen des Benutzers angepasst werden. Dies unterscheidet sie von einem Standard und macht sie flexibler. Ein Standard ist ein aufgrund eines Konsens entwickeltes Dokument, welches spezifische und essentielle Bedürfnisse für Material, Methoden, oder Abläufe ganz klar aufführt. Diese sind in unveränderter Form anzuwenden. Ein Standard kann zusätzlich dem eigenen Ermessen anheimgestellte Elemente enthalten, welche ganz klar definiert werden.

Wir hoffen, dass diese Richtlinien eine Basis für Labors darstellen, um ihre derzeitigen Abläufe zu überprüfen, um verbesserungswürdige Bereiche zu identifizieren und/oder kontinuierliche Verbesserungen gerichtet voranzutreiben oder das kontinuierliche professionelle Streben/Trainingsanstrengungen voranzubringen.

Zielgruppe

Die vorliegenden Richtlinien sind auf jedes Labor anwendbar, welches veterinärmedizinische Testverfahren durchführt (einschliesslich klinikeigener Labore). Bestimmte Empfehlungen für die statistische Qualitätskontrolle, die in diesem Dokument beschrieben werden, sind für Universitäten, Referenz- und kommerzielle Labors geeignet. Es ist nicht der Zweck dieses Dokumentes, pharmazeutische/toxikologische Laborabläufe anzusprechen, da diese durch Bestimmungen der GLP-Richtlinien ("Gute Laborpraxis" [Good Laboratory Practice (GLP)] reguliert werden; jedoch beinhaltet dieses Dokument einige Aspekte, die sich mit jenen Bestimmungen überlappen.

Bis vor Kurzem war die Leistung von in-clinic Instrumenten nicht gut genug charakterisiert, um Qualitätskontroll- und -sicherungsempfehlungen für praxiseigene Labors zuzulassen. Diese werden jedoch derzeit in einer Unterkommission innerhalb dieser Kommission bearbeitet.

Acknowledgement:
ASVCP thanks Nicole Stacy (Aquatic Animal Health, University of Florida, Gainesville, FL, USA), Ernst Leidinger (Invitro Laboratory, Vienna, Austria), and Stefanie Klenner (Justus-Liebig University, Giessen, Germany) for their translation.

Neu formatierte und überarbeitete ASVCP Qualitätskontrollrichtlinien

Prinzipien der Qualitätssicherung und Qualitätsstandards für die veterinärmedizinische Labordiagnostik

Inhaltsverzeichnis

1. **Wichtige präanalytische Faktoren für die veterinärmedizinische Labordiagnostik**
   - 1.1. Allgemeines, einschließlich Hämatologie, Endokrinologie, Blutchemie und Serologie
   - 1.2. Manuelle Untersuchung der Hämatologie von Nicht-Säugetieren
   - 1.3. Urinuntersuchung
   - 1.4. Zytologie/Mikrobiologie
   - 1.5. Blutgerinnungstests
   - 1.6. Kreuztest
   - 1.7. Radioimmunassay (RIA) – kein Eintrag

2. **Wichtige analytische Faktoren für die veterinärmedizinische Labordiagnostik**
   - 2.1. Allgemeines
     - 2.1.1. Überwachung
     - 2.1.2. Überprüfung von Testverfahren
     - 2.1.3. Geräteausstattung
     - 2.1.4. Fachwissen
     - 2.1.5. Qualitätskontrolle
     - 2.1.6. Leitfaden für Testverfahren
     - 2.1.7. Vergleich von Testergebnissen
     - *2.1.8. Identifizierung von ausgelagerten Tests [missing in the English original]*
   - 2.2. Klinische Blutchemie
   - 2.3. Hämatologie
   - 2.4. Manuelle Untersuchung der Hämatologie von Nicht-Säugetieren
   - 2.5. Harnuntersuchung
   - 2.6. Zytologie
   - 2.7. Blutgerinnung
   - 2.8. Kreuztest
   - 2.9. Radioimmunassay (RIA)

3. **Wichtige postanalytische Faktoren für die veterinärmedizinische Labordiagnostik**

1. Wichtige präanalytische Faktoren für die veterinärmedizinische Labordiagnostik

1.1. Allgemeines, einschließlich Hämatologie, Endokrinologie, Blutchemie und Serologie

1.1.1. **Probenentnahme, -handhabung und Transport zum Labor.** Informationen bezüglich Probenanforderungen, korrekte Probenentnahme, Verarbeitung , sowie Liefer- oder Versandverfahren sollten dem Kunden in elektronischer Form, als gedruckte Informationen (z.B. Laborservicebroschüre, Spezialinformationsblätter, Zeitschriften- oder Zeitungsartikel) oder in Form von persönlicher Telefonberatung zur Verfügung stehen. Proben müssen entsprechend anerkannter Standards entnommen werden. Die Bedienungsanleitungen von Geräteherstellern enthalten detaillierte Beschreibungen geeigneter Proben, einschließlich Probenbehälter und Bedingungen der Probenverarbeitung. Die Bedingungen für die Einsendung von Proben sollten Kunden von jedem Labor zur Verfügung gestellt werden. Die Proben müssen sorgfältig behandelt und zügig zum Labor transportiert werden, wobei die jeweiligen Bedingungen für die jeweilige Probe sowie deren Stabilität berücksichtigt werden müssen. Die Art der Probe (z.B. Blut, Serum, Plasma, Harn) muss ganz klar auf dem Probenetikett angegeben werden. Abweichungen von vorgegebenen Anweisungen können den jeweiligen Test nachteilig beeinflussen. Hersteller sollten für Details kontaktiert werden.

a. Hämatologie:

i. In der Klinik angefertigte Blutausstriche sollten nicht gekühlt werden und müssen während des Transports zum Labor vor Kondensation und Eis geschützt werden.

ii. Makroskopisch sichtbare Gerinnsel in antikoagulierten Proben für die Hämatologie können zu unterschiedlich fehlerhaften Ergebnissen führen. In diesem Falle sollte die Klinik schriftlich oder telefonisch durch das Labor informiert werden. Da der Grad der Ungenauigkeit nicht vorhergesagt werden kann, werden Proben mit Gerinnseln als ungeeignet für die Analyse eingeschätzt und es wird empfohlen, derartige Proben nicht zu analysieren. Falls fragwürdige oder qualitativ minderwertige Proben analysiert werden, sollten derartige Abweichungen schriftlich im Labor dokumentiert werden. Zusätzlich sollten jegliche Bemerkungen über ungenaue Ergebnisse für den Kliniker leicht sichtbar auf dem Bericht zu sehen sein und klar beschreiben, dass diese Ergebnisse möglicherweise ungenau und irreführend sein können.

1.1.2. **Probenidentifikation.** Proben sollten aufgrund der ihnen zugehörigen Informationen vom Labor identifiziert werden können. Diese Informationen beinhalten Angaben zu dem Tierbesitzer, Tierart, Signalement, Name der Klinik oder des Tierarztes,

Anschrift, Telefon- oder Faxnummern, Email-Adresse, Ort der Probenentnahme etc. Die Beschriftungen sollten auf dem Probenantrag und -behältnis angebracht werden und unmissverständlich einem Tier zugeordnet werden können.

1.1.3. **Testidentifizierung.** Die beantragten Tests sollten deutlich auf dem Antragsformular markiert oder aufgeführt werden.

1.1.4. **Probenannahme.** Probeninformation, -identifikation und beantragter Test sollten korrekt in das Laborinformationssystem (LIS) eingegeben werden. In das LIS eingegebene Informationen können dazu verwendet werden, die Probe zu lokalisieren bzw deren korrekte Lagerung zu überprüfen, z.B. Immunologie- im Gegensatz zur Hämatologie-Abteilung, oder im gefrorenen oder gekühlten Zustand. Die Probenaufteilung in die entsprechenden Abteilungen innerhalb des Labors oder zwischen verschiedenen Abteilungen sollte koordiniert ablaufen. Jede Art von Qualitätsproblem mit der Probe, ein- aber nicht ausschließlich Hämolyse, Lipämie, Gelierung der Probe oder analytische Probleme sollten notiert und an den Kunden sowie das Laborpersonal weitergegeben werden. Wenn die herabgesetzte Probenqualität das Ergebnis des Tests deutlich beeinträchtigen würde, sollte der Test mit dieser fragwürdigen Probe nicht durchgeführt werden und/oder die Ergebnisse sollten dem Einsender nicht berichtet werden. Die Ursachen für Probleme mit den dokumentierten oder nicht berichteten Proben sollten dem Kunden kommuniziert werden und möglichst eine neue Probe entnommen werden.

1.1.5. **Kundenkommunikation und Informationsvermittlung.** Kommunikation zwischen dem Laborpersonal und internen sowie externen Kunden in Bezug auf präanalytische Faktoren, die die Laboranalyse beeinflussen, sollte zeitnah und höflich erfolgen (z.B. unvollständiges Antragsformular, ungeeignete Probe oder Probenverarbeitung, schlechte Probenqualität). Kunden sollten über den Zeitpunkt der vorläufigen sowie endgültigen Berichterstattung informiert werden. Im gleichen Sinne sollte die Rückmeldung vom Kunden zum Labor ermutigt werden. Jede Art von verbalen oder schriftlichen Beschwerden/ Rückmeldungen/ Vorschlägen sollte schriftlich festgehalten und an die zuständige Person des Labormanagements weitergeleitet werden. Laborbesprechungen usw. müssen dokumentiert werden. Um korrigierende Maßnahmen nach Beschwerden etc in einem sinnvollen zeitlichen sowie koordinierten Rahmen durchzuführen, ist die Etablierung geeigneter Standardarbeitsanweisungen sinnvoll.

1.1.6. **Personalsicherheit.** Die Arbeitsbedingungen sollten angenehm und geeignet sein für Computereinträge, Datenübertragung, Probenverarbeitung, Probenentsorgung und alle anderen Aufgaben. Sich wiederholende Arbeitsabläufe sollten mit besonderer Betrachtung berücksichtigt werden. Persönliche Schutzausrüstung sollte angemessen sein für die Verarbeitung von Proben sowie die Bedienung von Geräten in allen Bereichen des klinischen Labors. Sicherheitsmaßnahmen für die Entsorgung von Proben, Abfall und anderes Zubehör sollten für unterschiedliche Materialien angegeben werden. Das Personal sollte in Sicherheit und biologischer Gefährdung bezüglich gefährlicher Chemikalien oder infektiöser Pathogene, die in biologischen Materialien vorhanden sein können unterwiesen werden. Informationsmaterial über Umwelt-, Gesundheits- und Sicherheitstraining sollten für das Personal leicht zugänglich aufbewahrt werden. Das Training sollte Grundprinzipien zur Vermeidung von bakterieller Kontaminationen und Informationen über zoonotische Erkrankungen beinhalten. Jede Art von Training sollte dokumentiert werden.

1.1.7. **Laborumgebung.** Die Laborumgebung sollte den Standardanforderungen an eine sichere, schnelle, ergiebige und effektive Arbeitsdurchführung entsprechen. Der Arbeitsplatz sollte gut beleuchtet und organisiert sein, um Effektivität und Sicherheit zu unterstützen. Die Ausrüstung und Geräte sollten auf den Arbeitsablauf ausgerichtet sein. Die Arbeitsanleitungen sollten auf dem neusten Stand und bei Bedarf leicht zugänglich sein. Die Laboreinrichtungen und der Laborbetrieb sollten den staatlichen Richtlinien entsprechen.

1.1.8. **Ansprüche an das Personal.** Das Laborpersonal sollte den Trainingsanforderungen für die Spezialgebiete des Labors entsprechen. Training, Fortbildung und wiederholte Zertifizierung für spezialisierte Aufgaben sollten regelmäßig angeordnet und dokumentiert werden. Das Labor sollte eine angemessene Zahl an Arbeitskräften einstellen, um das Arbeitsaufkommen bewältigen zu können.

1.1.9. **Laborinformations System (LIS).** Laborinformationssyteme bezwecken die Verbesserung von Arbeitsabläufen und der Effizienz des Labors. Bevor ein LIS eingerichtet wird, sollte es eingehend geprüft werden und seine Fähigkeit zur genauen Berichtsführung verifiziert werden. Ineffiziente und unhandliche LIS sollten je nach Bedarf des Labors auf den neusten Stand gebracht oder verbessert werden. LIS sollten allen staatlichen Richtlinien für medizinische Laborbefunde entsprechen. Probleme beim Zugriff auf Proben oder Archivierung sollten sofort korrigiert werden.

1.1.10. **Außer-Haus-Tests**. Kunden sollten über diejenigen Tests, die von anderen Labors durchgeführt werden, unterrichtet werden.

1.2. Manuelle Untersuchung der Hämatologie von Nicht-Säugetieren

1.2.1. **Probenentnahme, -handhabung und Transport zum Labor.** Akzeptable Transportzeiten für Blutproben von Vögeln sind kürzer als für Blutproben von Säugetieren oder Reptilien. Kontrollierte Studien haben gezeigt, dass gekühlte Blutproben von Vögeln unabhängig vom Antikoagulans innerhalb von zwölf Stunden abgebaut werden (Harr et al 2005). Akzeptable Transportzeiten für Blutausstriche von Vögeln und Reptilien sind ähnlich wie von Säugetieren. Leukozyten/Thrombozytenaggregate, welche in der Zählkammer auffallen, sollten dokumentiert werden, um verfälschte absolute Leukozytenzahlen sowie Prozentsätze im Differentialblutbild zu vermeiden. Blutproben von Haifischarten sollten innerhalb von 5 Stunden verarbeitet werden (Arnold 2005). EDTA (7,5% oder 1-2 mg/ml Blut) eignet sich für die meisten Tierarten, jedoch nicht für alle. Blutproben von Rochen, einigen Knochenfischen und einigen Vogelarten reagieren in kommerziell produzierten EDTA Behältern untypisch. Blutproben von Knorpelfischen (Haie und Rochen) sollten aufgrund der hohen Plasma-Osmolalität (≈ 1000 mmol/kg) mit einem pulverisierten Antikoagulans vermischt werden. Flüssige Antikoagulantien können der Osmolalität entsprechend angepasst werden.

1.2.2. **Ansprüche an das Personal.** Das Laborpersonal sollte bezüglich Probenbehandlung und -vorbereitung für exotische Tierarten speziell trainiert werden. Das Training sollte Grundprinzipien der Vermeidung von bakterieller Kontamination und Unterweisung über zoonotische Krankheiten einschliesslich Chlamydophila, West Nile Virus, Salmonellen, Vogelgrippe und Giardien beinhalten. Dokumentation des Trainings, Fortbildungen und periodische Leistungsbeurteilung sollte nach Ermessen des Laborleiters durchgeführt und überwacht werden.

1.3. Harnuntersuchung

1.3.1. **Probenentnahme, -handhabung und Transport zum Labor.** Die Identifikation der Methode der Harnentnahme ist wichtig für die qualitative und quantitative Interpretation von möglichen Verunreinigungen einschließlich Blut und Bakterien. Der Einsender sollte die Methode der Harnprobenentnahme deutlich angeben, zum Beispiel Spontanharn (früher oder später Mittelstrahl), Katheterisierung, Zystozentese, oder vom Boden des Käfigs stammender Harn. Klare Harnprobenbehälter können verwendet werden, um die visuelle Untersuchung des Harns zu erleichtern, falls der Harn innerhalb von 30 Minuten untersucht wird.

Allerdings sollte bei Verzögerung der Urinuntersuchung die Urinprobe vor UV-Licht geschützt werden, um den Abbau von Harninhaltsstoffen (z.B. Bilirubin) zu vermeiden. Die Deckel sollten sicher schließen, um die Verdunstung und/oder Verflüchtigung von Harninhaltsstoffen zu vermeiden (z.B. Ketone).

1.3.2. **Lagerung von Harnproben**. Harn sollte idealerweise innerhalb von 30 Minuten untersucht werden. Falls eine sofortige Untersuchung nicht möglich ist, sollte die Harnprobe bei Kühlschranktemperatur aufbewahrt werden, um Veränderungen der physikalischen und chemischen Zusammensetzung zu minimieren und bakterielles Wachstum zu verhindern. Strikte Empfehlungen für die Dauer der Kühlung von Harn können nicht vorgegeben werden, da diese von entsprechenden Harninhaltsstoffen abhängen (Rabinovitch 2009). Eine maximale Lagerung von 24 Stunden wird allgemein empfohlen (Osborne schlägt vorsichtigerweise 6 bis 8 Stunden vor), jedoch kann Harn in Abhängigkeit von seiner anfänglichen Zusammensetzung für kürzere oder längere Zeit stabil sein. Besonders instabile chemische Komponenten sind Bilirubin und Glukose, sowie pH-Wert in Gegenwart von Bakterien (Rabinovitch 2009; Osborne 1999). Die Stabilität von geformten Bestandteilen ist vom pH des Urins und seiner Konzentration abhängig. Harnkristalle können sich während der Lagerung bei Raum- oder Kühlschranktemperatur *in vitro* bilden (Albasan 2003; Sturgess 2001). Wenn Kristallurie klinisch vermutet wird, sollte eine frisch entnommene Harnprobe direkt untersucht werden. Gekühlte Harnproben sollten vor der Untersuchung auf Raumtemperatur aufgewärmt werden. Da die Ergebnisse der Urinuntersuchung von Lagerdauer und -temperatur beeinflusst werden können, sollte der Zeitpunkt der Probenentnahme, die Ankunftszeit im Labor und die Lagermethode notiert werden. Alternative Konservierungsmethoden sind für die Stabilisierung harnchemischer Parameter, zur Verhinderung von bakteriellem Wachstum und zur Konservierung von geformten Bestandteilen verfügbar. Die Anweisungen der Hersteller bezüglich des beabsichtigen Gebrauchs eines bestimmten Konservierungsmittels und dessen Lagerdauer sollten befolgt werden.

1.3.3. **Harnkultur.** Quantitative mikrobiologische Kulturtechniken werden bei signifikanter Bakteriurie empfohlen. Durch Zytozentese gewonnene Harnproben werden bevorzugt, jedoch sind angemessen entnommene Katheterproben und Spontanharnproben akzeptabel, wenn quantitative Kulturmethoden angewendet werden. Harn sollte vor der eigentlichen Untersuchung zuerst für die Bakteriologie eingereicht werden, um die Verunreinigung der Probe zu vermeiden. Alternativ kann ein steriler Anteil der Probe für eine mögliche bakteriologische Untersuchung beiseite gelegt werden. 6 Stunden bis 24 Stunden lang gekühlte Harnproben sind für

die Bakteriologie akzeptabel. Die Kühlung von Urinproben über 24 Stunden kann zu falsch negativen Kulturergebnissen führen (Padilla 1981). Wenn bakteriostatische Transportmedien verwendet werden, müssen die Harnproben nicht gekühlt werden.

1.4. Zytologie/Mikrobiologie

1.4.1. **Probenentnahme, -handhabung und Transport zum Labor.** Informationen bezüglich zytologischer und mikrobiologischer Einsendungen sollte jedem Kunden in Form von einer Laborservicebroschüre, Informationsblättern, Zeitschriftenartikeln, gedruckten Materialien oder mündlichen Anweisungen zur Verfügung gestellt werden. Je nach Relevanz sollten Anweisungen zu Themen wie Methoden der Probenentnahme, geeignete Behälter (mit oder ohne Antikoagulanz), Erstellung eines Ausstriches und Probenfixierung enthalten sein. Die geeignete Entnahme von zytologischen/mikrobiologischen Proben erhöht die Wahrscheinlichkeit einer korrekten Interpretation.

1.4.2. Unfixierte Zytologieproben und luftgetrocknete, ungefärbte Zytologieausstriche sollten vor der Einwirkung von Formalin und Formalindämpfen geschützt werden, die den anschließenden Färbeprozess beeinflussen. Dazu werden dicht verschlossene Behältnisse oder eine separate Einsendung, getrennt von Formalin-fixierten Biopsieproben empfohlen.

1.4.3. Identifikation des Ortes der Probenentnahme, die verwendete Methode und Entnahmezeit haben große Bedeutung für die optimale Probenbearbeitung sowie für deren Interpretation. Der veterinärmedizinische Zytologe oder Zytopathologe sollte eine fundierte Kenntnis über die Auswirkungen von verschiedenen Entnahmemethoden, verzögerte Herstellung sowie unangemessene Bearbeitung von zytologischen Proben, besonders Körperflüssigkeiten, speziell in Bezug auf zytologische Besonderheiten und deren Interpretation haben. Ein oder mehrere Ausstriche sollten von Körperflüssigkeiten direkt hergestellt werden, bevor Methoden zur Konzentration oder Fixierung angewendet werden. Der Ausstrich/die Ausstriche können gefärbt oder ungefärbt belassen werden und sollten zusammen mit dem Punktat eingesandt werden. Dies ermöglicht eine Schätzung der Zellzahl sowie des Anteiles der verschiedenen Zelltypen. Dies kann wertvolle Informationen liefern und somit die zytologische Interpretation beeinflussen. Zudem stellt dies eine zusätzliche Qualitätskontrolle dar, indem der Zytologe/Zytopathologe bestätigen kann, dass die Zellzählungen in vernünftiger Weise mit den Zellzahlschätzungen vom Ausstrich übereinstimmen.

1.5. Blutgerinnungstests

1.5.1. **Probenentnahme, -handhabung und Transport zum Labor.** Befolgung der Bestimmungen für Probenentnahme und -lagerung für die Blutgerinnung ist zwingend notwendig für genaue Testergebnisse. Gesamtblut sollte in Tri-Natrium-Citrat-Röhrchen im Verhältnis 9:1 entnommen und gut vermischt werden. Das Blutröhrchen wird dazu bis zur Füllmarke aufgefüllt. Proben, die nicht dieser Verdünnung entsprechen, sollten vom Labor nicht angenommen werden (Adcock 1998). Bei sehr anämischen und polyzythämischen Patienten muss das Citratvolumen dementsprechend angepasst werden (Stockham/Scott 2008, Seite 277). Für Tests, die Plasma erfordern, wird das Citratblut zentrifugiert und bei 2-8 °C gelagert. Das Plasma sollte von Blutzellen getrennt werden und in ein Plastikröhrchen pipettiert werden (kein Glasbehälter) (Fiebig 2005; Kratz 2006). Die Probenstabilität beträgt 4 Stunden bei Raumtemperatur und 24 Stunden bei Kühlschranktemperatur (2 - 8°C). Wenn die Testanalyse nicht innerhalb dieser Zeiträume durchgeführt werden kann, sollten die Proben bei -20°C eingefroren werden (Adcock 1998). Frisches zitriertes Vollblut für Thrombozytenfunktionstests oder andere Blutgerinnungstests sollte idealerweise weniger als 1 Stunde gelagert werden (Giger, persönliche Mitteilung). Wenn Proben in ein Labor versandt und nicht direkt dort abgegeben werden, dann sollte das Plasma in ein Plastikröhrchen übertragen und eingefroren werden, sowie anschließend auf Eis verpackt und versandt werden, um in gefrorenem Zustand innerhalb von 24 Stunden im Labor anzukommen.

1.5.2. **Siehe Laborinformationsblatt 1 1.5.1.A** Zusätzliche Details sind dort aufgeführt, da über 90% der Fehler bei Blutgerinnungstestergebnissen von präanalytischen Faktoren bei Transport und Bearbeitung verursacht werden (Lippi 2006; Valenstein 2009; Bonini 2002; Dale 2002).

1.6. Kreuzprobe

1.6.1. **Probenentnahme, -handhabung und Transport zum Labor.** Serum oder Plasma kann für den Kreuztest verwendet werden; jedoch können die Tierart und bestimmte Methoden die Wahl zwischen diesen beiden beeinflussen. Für den Nachweis von Komplement als Ursache einer Hämolysereaktion, kann frisches Serum bei Hunden und Katzen herangezogen werden, doch wird davon überlicherweise kein Gebrauch gemacht. Proben für die große Kreuzprobe umfassen Serum (Blutröhrchen ohne Zusatz) oder Plasma (EDTA oder Citrat) vom Empfänger, sowie antikoaguliertes Gesamtblut (EDTA, ACD oder Citrat) oder konzentrierte Erythrozyten von dem Spender/den Spendern. Proben für den kleinen Kreuztest

inkludieren antikoaguliertes Gesamtblut vom Empfänger und Serum oder Plasma von dem Spender bzw. den Spendern. Patienten- und Spenderproben sollten möglichst nicht älter als 24 Stunden sein. Spenderproben können so alt sein wie das Transfusionsblut für den Kreuztest. Proben, die nicht sofort verwendet werden, sollten bei 4°C gelagert werden. Für einige Methoden wird Gesamtblut verwendet, wobei andere Methoden eine, in PBS-gewaschene Erythrozytensuspensionverwenden. Allgemeine Empfehlungen für die Probenentnahme, handhabung und Transport von Hämatologieproben sollten berücksichtigt werden.

1.6.2. **Probenidentifikation.** Proben vom Patienten und von dem Spender/den Spendern sollten deutlich beschriftet sein mit Patientennamen bzw. Spendernamen, sowie Datum und Zeitpunkt der Probenentnahme, damit Patienten- und Spenderproben korrekt identifiziert werden können. Spezielle Antragsformulare sollten verwendet werden, um Patienten und Spender exakt zuordnen zu können.

1.7. **Radioimmunassay (RIA)** – diese Sektion ist vorläufig absichtlich ohne Eintrag. Siehe Hegstad-Davies 2006 für entsprechende Literatur.

2. Wichtige analytische Faktoren für die veterinärmedizinische Labordiagnostik

2.1. Allgemeines

2.1.1. Überwachung

a. **Internes Monitoring**. Ein internes Monitoring aller Instrumente inklusive elektronischer Sicherheit, Kalibrierung, Wartung und Leistungsfähigkeit der Geräte wird empfohlen. Ebenso wird ein Protokoll über die Leistungsmerkmale jedes Gerätes empfohlen, einschließlich aller aufgetretenen Probleme, sowie deren Untersuchung und Behebung. Der Gebrauch von Qualitätskontrollmaterialien zur Überwachung der internen Leistungsfähigkeit ist im Detail im Abschnitt 2.1.5. Qualitätskontrolle beschrieben. Angesammelte Ergebnisse der Qualitätskontrolle sollten regelmäßig systematisch unter Benutzung von Levy-Jennings-Diagrammen überprüft werden. Dementsprechend sollten geeignete Maßnahmen getroffen werden, wenn die Ergebnisse der Qualitätskontrolle die gesetzten Qualitätsgrenzen übersteigen oder unerwünschte Trends zeigen (Westgard 2006).

b. **Externes Monitoring** (Proficiency Testing). Die externe Überwachung sollte die Teilnahme an externen Leistungsfähigkeitsprogrammen beinhalten, die speziell auf veterinärmedizinische Labors ausgerichtet sind. Eine ausführliche Beschreibung der Monitoring-Prozesse kann in Bellamy und Olexson nachgelesen werden (Bellamy 2000)

   i. Alle teilnehmenden Labors sollten die gleichen Proben analysieren.
   ii. Die Ergebnisse sollten regelmäßig tabellarisch erfaßt werden (monatlich, vierteljährlich oder jährlich) und an die Teilnehmer mit statistischen Zusammenfassungen, welche die Genauigkeit des individuellen Labors im Vergleich zum Gruppendurchschnitt darstellen, zurückgesandt werden.
   iii. Durchschnittswerte sollten in Abhängigkeit von der Methode berechnet und analysiert werden (gleiche Methoden im Vergleich).
   iv. Das Ergebnis des externen Monitorings sollte von jedem Labor sorgfältig ausgewertet werden. Eine massive Abweichung vom Gruppendurchschnitt sollte eine sofortige Untersuchung nach sich ziehen.

2.1.2. **Methodenvalidierung.** Vor der Inbetriebnahme eines neuen Testverfahrens oder eines neuen Gerätes sollte eine Validierung der Methode bzw. des Gerätes durchgeführt werden, um sicherzustellen, dass das Verfahren den Standards des Labors und den Herstelleransprüchen entspricht. Die Validierung der Methode oder des Gerätes sollte Linearität, Präzision, Genauigkeit, Messbereich, untere

Nachweisgrenze/biologische Nachweisgrenze/funktionelle Sensitivität der Methode umfassen und die Einflüsse von interferierenden Substanzen untersuchen. Referenzintervalle und Verfahren zur Qualitätskontrolle für die neue Methode sollten bestimmt werden, bevor Patientenproben analysiert werden. Falls nur eingeschränkte Daten für die Bestimmung von Referenzintervallen zur Verfügung stehen, sollte dies in einem Merkblatt zum Test angeführt werden und die Grundlage für die Interpretation erklärt werden (Linnet 2006).

Analytische Qualitätsanforderungen, wie z.B. der gesamtzulässige Fehler (Total allowable error, TEa) oder klinische Entscheidungsgrenzen sollten für jeden einzelnen Test ermittelt werden, bevor Studien zur Überprüfung des Testverfahrens oder des Gerätes begonnen werden (Westgard 1974). Diese Anforderungen dienen als Maßstab für die Leistungsfähigkeit des Tests. Der TEa eines neuen Testverfahrens oder eines Gerätes, der mit Hilfe von Validierungsstudien ermittelt wird, muss sich innerhalb dieser Spezifikationen bewegen, oder das neue Verfahren sollte zurückgewiesen werden (Westgard 2006).

Die Verfahren zur Validierung einer Methode bzw. des Gerätes sind im Folgenden in der Reihenfolge aufgeführt, in der sie durchgeführt werden. Zahlreiche kommerzielle Softwareprogramme sind erhältlich, die die statistische Analyse von Validierungsstudien erleichtern. Zusätzliche Informationen und Grafikprogramme für die Validierung von Testverfahren können unter folgendem Link gefunden werden: www.westgard.com

a. **Linearitätsstudie:** Bestimmung des Messbereiches einer Methode.
   i. Fünf Verdünnungsstufen werden empfohlen und können dementsprechend vorbereitet werden. Lösungen mit einer Matrix, die der eigentlichen Probe nahekommt sind Verdünnungen mit Wasser oder Salzlösungen vorzuziehen (Westgard 2008a).
      Stufe 1: Konzentration nahe der Nachweisgrenze des Tests
      Stufe 2: 3 Teile niedrige Konzentration plus 1 Teil hohe Konzentration
      Stufe 3: 2 Teile niedrige Konzentration plus 2 Teile hohe Konzentration
      Stufe 4: 1 Teil niedrige Konzentration plus 3 Teile hohe Konzentration
      Stufe 5: Konzentration, welche die die erwartungsgemäße obere Linearitätsgrenze des Tests übersteigt
   ii. Drei bis vier wiederholte Messungen von jeder Probe werden empfohlen (Westgard 2008a).

iii. Der Durchschnittswert für jede Probe wird auf der Y-Achse und der erwartete Wert auf der x-Achse aufgetragen (Westgard 2008a).

iv. Das Diagramm wird auf Ausreißer, Linearität und Lage der Mittelwertlinie überprüft (Westgard 2008a).

v. Wenn der Test nicht in die, vom Hersteller empfohlenen Grenzen fällt, sollte das Testverfahren zurückgewiesen werden. Der Bereich kann alternativ dazu auch so verändert werden, dass er innerhalb des linearen Bereiches fällt.

b. **Kurzzeit-Replikationsstudie** (Wiederholbarkeit): Abschätzung des Zufallsfehlers oder Ungenauigkeitsfehlers eines Testverfahrens über einen kurzen Zeitraum. Proben, die in einer einzigen 8-stündigen Arbeitsschicht oder innerhalb eines einzigen analytischen Arbeitsgangs analysiert werden (Westgard 2008c).

i. Standardlösungen, kommerziell erhältliche Kontrollproben oder gepoolte frische Patientenproben können verwendet werden.

ii. Die Konzentration des Parameters sollte im Bereich klinischen Entscheidungsgrenzen liegen. Es wird ein Minimum von 2 Konzentrationen (normal und hoch) empfohlen, wenn eine Erhöhung des Parameters medizinisch bedeutsam ist. Mindestens 3 Konzentrationen (niedrig, normal und hoch) werden empfohlen, wenn eine Verminderung oder Erhöhung des Parameters medizinisch bedeutsam sind.

iii. Während des Zeitraums der erfasst werden soll werden mindestens 20 Wiederholungstests empfohlen.

iv. Eine Normalverteilung wird ermittelt, indem die Daten in ein Histogram oder eine Punktwolke (= dot plot scattergram, ist hat meant here?) eingetragen werden. Falls keine Normalverteilung vorliegt, sollten die Daten auf Ausreißer untersucht werden. Die Ursache für die Ausreißer sollte ermittelt und wenn möglich korrigiert werden. Falls eine Normalverteilung nach Ausschluss von möglichen Ausreißern nicht erzielbar ist, dann sollten die Daten für zusätzliche statistische Analysen gegebenenfalls transformiert werden.

v. Die Datenanalyse umfasst die Kalkulation von Mittelwert, SD (Standardabweichung) und CV (Coefficient of Variation/Variationskoeffizient).

vi. Vergleichen sie SD und CV, als Maß des Zufallsfehlers mit dem Laborstandard (TEa oder klinische Entscheidungsgrenze). Wenn SD oder CV den Standard übersteigen, sollte der Test nicht akzeptiert werden. Für diese anfängliche Begutachtung wird ein Bias von Null angenommen.

Zusätzliche Analysen, die den Bias beinhalten (ermittelt durch die Vergleichsmethodenstudie), sollten durchgeführt werden, sobald diese Information verfügbar ist.

c. **Langzeit-Replikationsstudie (Reproduzierbarkeit):** Schätzung des Zufallsfehler (random error = RE) oder der Ungenauigkeit des Testverfahrens über einen längeren Zeitintervall, der den reellen Arbeitsbedingungen gleichkommt. Ein Minimum von 20 Proben wird während verschiedenen Arbeitsschichten (und –durchläufen) über mindestens 20 Tage lang analysiert. Probenauswahl und Datenanalyse sind die Gleichen wie für die Kurzzeit-Replikationsstudie.

d. **Methodenvergleich:** Schätzung des Bias oder des systematischen Fehlers des (neuen) Testverfahrens im Vergleich zur Vergleichsmethode, falls eine solche existiert.
   i. Wählen Sie die Vergleichs (Referenz-) methode unter Berücksichtigung von bekannter Genauigkeit und Qualität aus. Die Vergleichsmethode kann eine maßgebliche Methode sein, eine Referenzmethode, oder eine andere Feldmethode nach Definition von Tietz (Tietz 1979).
   ii. Ein Minimum von 40 Patientenproben, die mit beiden Methoden geprüft werden, wird empfohlen (Jensen 2006; Westgard 2008d).
   iii. Die Probenkonzentrationen sollten den Bereich möglicher Testergebnisse wiederspiegeln, der in der klinischen Anwendung des Verfahrens zu erwarten ist, und sollten den gesamten Konzentrationsbereich mit einer angemessenen Probenanzahl an den Grenzen dieses Bereiches umfassen (Jensen 2006).
   iv. Doppelbestimmungen mit jedem Testverfahren sind wünschenswert, jedoch sind Einzelmessungen akzeptabel (Jensen 2006). Ergebnisse sollten zum Zeitpunkt der Untersuchung überprüft werden. Wenn ein signifikanter Unterschied zwischen den mit beiden Methoden erzieltenWerte festgestellt wird, sollte die Analyse sofort wiederholt werden, um festzustellen, ob der Unterschied erneut auftritt oder ob ein Fehler in der Probenanalyse vorlag.
   v. Proben sollten innerhalb von 2 Stunden (oder rascher, abhängig von der Stabilität des Parameters) mit der neuen Methode und der Vergleichsmethoden analysiert werden. Die Probenhandhabung sollte genau festgelegt sein, um präanalytische Fehler als Ursache von Abweichungen zwischen den Methoden zu vermeiden. Wenn Proben von

verschiedenen Labors analysiert werden (>2 Stunden Intervall zwischen den Tests), muss die Probenstabilität berücksichtigt werden.

vi. Die Studie sollte über 5 bis 20 Tage durchgeführt werden, mit Bevorzugung der längeren Zeitperiode, z.B. 2 bis 5 Proben pro Tag über 20 Tage

vii. Datenanalyse:

1. Ein Vergleichsdiagramm für die visuelle Prüfung des neuen Testverfahrens (y-Achse) mit der Vergleichsmethode (x-Achse) wird empfohlen. Ausreißer sollten wiederholt analysiert werden, solange die Probe frisch ist. Eine „Regressionsgerade“ kann basierend auf der visuellen Beurteilung der Daten gezogen werden (Jensen 2006).
2. Die Berechnung eines Korrelationskoeffizienten (r) wird verwendet, um zu bestimmen, welche statistische Gleichung verwendet werden sollte, um den systematischen Fehler (Bias) abzuschätzen, dieser darf jedoch nicht als Maß für die Übereinstimmung der Methoden verwendet werden. Für Parameter die sich über einen weiten analytischen Bereich erstrecken wird typischerweise die Regressionsanalyse zur Bestimmung des systematischen Fehlers (Bias) verwendet (Jensen 2006; Westgard 2008d). Für Parameter, die nur in einem engen Konzentrationsbereich schwanken (Elektrolyte), werden t-Tests verwendet, um den systematischen Fehler (Bias) zu bestimmen (Westgard 2008d).

   • Falls r ≥ 0,99 für Daten mit einem weiten Konzentrationsbereich oder > 0,975 für Daten mit engen Bereich, können Standard-Regressionsanalysenstatistiken benutzt werden, um den systematischen Fehler (Bias) im klinisch wichtigen Bereich abschätzen zu können (Jensen 2006; Westgard 2006d; Stockl 1998). Der Systemfehler (Bias) auf einer bestimmten Entscheidungsebene (Xc) kann durch die Berechnung des zugehörigen y-Wertes (Yc) auf der Regressionsgeraden bestimmt werden.

   Yc = a(Steigung)Xc + b(y-Achsenabschnitt)
   SE (Systemfehler; Bias) = Yc – Xc

• Falls r < 0.99 (oder <0.975), können die Daten entweder durch die Sammlung von zusätzlichen Datenpunkten oder durch die Reduzierung der Varianz mit Durchführung von Wiederholungsmessungen verbessert werden. Weiterhin können gepaarte t-Tests benutzt werden, um den systematischen Fehler (Bias) als Ursache des Unterschiedes zwischen den durchschnittlichen Ergebnissen der beiden Methoden abzuschätzen (Jensen 2006; Westgard 2008d). Jedoch ist der gepaarte T-Test bei Anwesenheit eines proportionalen Fehlers nicht anwendbar (Westgard 2008d). Ersatzweise kann die Regressionsanalyse nach Passing-Bablok oder Deming verwendet werden. Zur zusätzlichen Beurteilung der Durchschnittswerte in klinisch bedeutsamen Bereichen kann die Aufteilung der Ergebnisse in 2 Gruppen (unter, innerhalb oder über dem Referenzintervall) verwendet werden (Jensen 2006).

viii. Die Erstellung eines Differenz-Diagramms (Bland-Altman) wird gleichfalls empfohlen. Der Unterschied zwischen dem Test und der Vergleichsmethode wird grafisch auf der y-Achse und der Durchschnittswert beider Methoden auf der x-Achse dargestellt. Die Differenzlinie identifiziert SE (Bias; systematische Fehler). Für Tests ohne Bias sind die Ergebnisse um die Nulllinie verteilt, etwa ½ über und ½ unterhalb dieser Linie (Bland 1986; Jensen 2006; Hyloft 1997).

ix. Kriterien für eine akzeptable Leistung hängen vom TEa ab, der von jedem Labor bestimmt werden sollte. Der berechnete Gesamtfehler (TE calc) beinhaltet SE (Bias; systematischer Fehler), der durch jedes Vergleichsexperiment bestimmt wird, sowie die Bestimmung von RE (S) durch die die Langzeit-Replikationsstudie. TE calc = Bias (gemessen) + 3S (gemessen). Die Leistung wird als akzeptabel befunden, wenn TE calc < TEa. Eine Methodenbeurteilungs-Entscheidungstabelle, die TEa, SE und RE berücksichtigt, kann ebenso verwendet werden, um die Akzeptierbarkeit der Methode zu bestimmen (Westgard 2008b).

e. **Interferenzanalyse:** Abschätzung des systematischen Fehlers, der durch Störsubstanzen in den analysierten Proben verursacht wird. Diese Fehler sind typischerweise konstant, wobei sich die Fehlergrösse proportional zur

Konzentration der Störsubstanz verhält (Westgard 2008f). Häufige Interferenzen sind Hämolyse, Lipämie und Bilirubin (Bellany 2000). Zusätzliche Vergleiche können zwischen heparinisiertem Plasma im Vergleich zu Serum, sowie Serumproben in Trenngelröhrchen im Vergleich zu Röhrchen ohne Beschichtung oder anderen möglichen Störfaktoren gemacht werden. Je nach Test oder Gerät können unterschiedliche Einflüsse von Interesse sein.

i. Standardlösungen, Patientenproben oder gepoolte Patientenproben können verwendet werden. Die beiden letzteren sind zu bevorzugen, weil sie eher verfügbar sind und eine komplexe Matrix haben (Westgard 2008f). Proben mit unterschiedlichen Konzentrationen des Parameters, die zumindest den klinisch interessanten Bereich überspannen, sollten gewählt werden (Westgard 2006).

ii. Definierte Mengen an Hämoglobin (von lysierten Erythrozyten), Lipiden (kommerziell erhältliche Lösungen) und Bilirubin (kommerzielle Standardlösungen) werden den Proben hinzugefügt, um erhöhte Konzentrationen der Interferenzsubstanz zu erreichen(Westgard 2008f).

iii. Das Volumen der zugefügten Störsubstanz sollte so niedrig wie möglich gehalten werden, um Veränderungen der Probenmatrix zu vermeiden (Westgard 2008f). Eine Doppelbestimmung aller Proben wird empfohlen. Kleine Unterschiede im gemessenen Parameter, die von der Störsubstanz verursacht werden, können vom methodeneigenen Zufallsfehler überdeckt werden. Doppelbestimmungen sind hilfreich, um dieses Problem zu vermeiden (Westgard 2008f).

iv. Messungen sollten mit der neuen Methode sowie der Vergleichsmethode durchgeführt werden, falls eine solche existiert. Wenn beide Methoden einen ähnlichen, durch die Störsubstanzen verursachtes systemischen Fehler zeigen, dann kann der systematische Fehler alleine eventuell nicht ausreichend sein, um den neuen Test zurückzuweisen (Westgard 2008f).

v. Kalkulation des Bias auf Basis der Störsubstanz:
   1. Bestimmen Sie nach den Doppelmessungen den Durchschnittswert der Störsubstanz enthaltenden Probe und der Kontrollprobe.
   2. Berechnen Sie die Differenz (Bias) zwischen der, die Störsubstanz enthaltenden Probe und seiner Kontrolle. Wiederholen Sie dies für alle Probenpaare.
   3. Berechnen Sie die Durchschnittsdifferenz (Bias) für alle Proben, die eine vorgegebene Konzentration der Störsubstanz enthalten.

vi. Zum Vergleich von Ergebnissen der Störsubstanz enthaltenden Probe und der unverfälschten Kontrollprobe wird ein gepaarter t-Test empfohlen.

Regressions-Statistiken sind nicht anwendbar. Eine t-Test-Statistik von 2 wird als der Standard-Grenzwert verwendet. Die t-Test-Statistik schätzt die Anzahl der Standardabweichungen, die die verfälschte Probe von der unverfälschten unterschiedlich ist (Westgard 2008f).

vii. Das Kriterium für eine akzeptable Leistungsfähigkeit ist SE (gemessen) < TEa. Falls SE (gemessen) > TEa, sollte das Labor entscheiden, ob Proben die wahrscheinlich die Störsubstanzen enthalten, ohne weiteres entdeckt werden können und ob Proben zurückgewiesen werden sollten, falls mögliche Störsubstanzen vorhanden sind oder ob ihre Auswirkungen aufgrund von zusätzlichen Studien quantifiziert oder semiquantifiziert werden könnten.

f. **Wiederfindungsanalyse**: Schätzung des proportionalen systematischen Fehlers (SE). Der proportionale systematische Fehler tritt auf, wenn eine Substanz in der Probenmatrix mit dem Parameter reagiert und mit dem analytischen Reagenz konkurriert. Die Grösse des SE steigt mit zunehmender Konzentration des Parameters. Der proportionale SE wird bestimmt, indem der Prozentsatz der Wiederfindung eines Standardanalyten der zu der Patientenprobe hinzugefügt wurde, berechnet wird (Westgard 2008f).

i. Standardlösungen einer hohen Konzentration werden oft verwendet, da sie in geringen Mengen beigefügt werden können, um einerseits die Probenverdünnung so gering wie möglich zu halten, und um andererseits eine erkennbare und signifikante Veränderung der Parameterkonzentration zu erreichen. Die Verdünnung der ursprünglichen Probe sollte 10% nicht übersteigen.

ii. Die Konzentration des beigefügten Parameters sollte die nächste medizinische Entscheidungsebene für diesen Parameter erreichen. Ähnlich wie bei der Interferenzanalyse werden kleine Beimengungen von der inherenten Ungenauigkeit der Methode stärker beeinflusst als größere Beimengungen.

iii. Wiederholungsmessungen der verfälschten sowie der Kontrollprobe werden empfohlen. Wiederfindungsproben sollten mit der Test- und der Vergleichsmethode analysiert werden. Die Anzahl der zu testenden Patientenproben hängt von der Anzahl und der Art der Reaktionen ab, die zu erwarteten sind, um einen systematischen Fehler zu produzieren.

iv. Wenn eine Wiederfindungsstudie als Teil eines neuen Testverfahrens durchgeführt wird, sollte idealerweise die neue sowie eine Vergleichsmethode verwendet werden, falls letztere vorhanden ist.

v. Berechnung der Daten (folgender Link zeigt ein Beispiel der Berechnungen, die in einer Korrekturstudie angewendet werden: http://www.westgard.com/lesson27.htm#4 (zugegriffen am 10. November 2009) oder Nachzulesen in Westgard 2008f)

1. Berechnen Sie die zugefügte Menge des Analyten: Zugefügte Konzentration des Standards x (ml zugefügte Standardmenge/ml zugefügte Standardmenge + ml Probe)
2. Berechnen Sie den Durchschnittswert der Wiederholungsmessungen für alle Proben.
3. Berechnen Sie den Unterschied zwischen der verfälschten und der Kontrollprobe.
4. Berechnen Sie die Korrektur, indem Sie die Differenz mit der zugefügten Menge addieren.
5. Berechnen Sie den Durchschnittswert der Korrekturen von allen getesteten Probenpaaren.
6. Berechnen Sie den proportionalen Systemfehler SE als 100% - Korrektur %.

vi. Das Kriterium für eine akzeptable Leistung ist SE (gemessen) < TEa. Geringe Mengen des proportionalen Systemfehlers können akzeptabel sein; die Methode sollte allerdings abgelehnt werden, wenn große proportionale systematische Fehler den erlaubten Gesamtfehler übersteigen.

g. **Rerenzinterval für die neue Methode/das neue Gerät:** Erstellung eines neuen Referenzintervalls oder Validierung eines bestehenden Referenzintervalls ist für den klinischen Entscheidungsprozess notwendig.
Siehe Neue ASVCP Richtlinien für die Erstellung von Referenzintervallen und Entscheidungs-Schwellenwerte sowie Instandhaltung.

h. **Bestimmung der Nachweisgrenze**: Abschätzung der niedrigsten Konzentration eines messbaren Parameters. Die Verifizierung der Nachweisgrenze wird für alle Tests empfohlen, bei denen ein niedriger Wert von klinischer Bedeutung sein kann, z.B. forensische Tests, therapeutische Medikamentenlevel, TSH, Immunanalyse und Tumormarker (Westgard 2008g).
i. Es werden eine Leerprobe ohne den Parameter von Interesse und eine „gespikte“ Probe mit einer geringen Menge des Analyten verwendet. Unter Umständen sind mehrere gespikte Proben erforderlich, die den Analyten in einer vom Hersteller angegebenen Konzentration enthalten.

ii. 20 Wiederholungsmessungen sollten für jede Probe durchgeführt werden.
iii. Die Messungen der Leerprobe können am gleichen Tag, als „Kurzzeit-“ oder „Langzeitstudie“ durchgeführt werden. Jedenfalls sollte die gespikte Probe über einen längeren Zeitraum analysiert werden, um so Variationen von Tag zu Tag oder zwischen den Durchläufen mit einzubeziehen. Eine Minimum von 5 Tagen wird normalerweise verwendet (Westgard 2008 g).
iv. Quantitative Schätzungen könnnen folgendermaßen berichtet werden:

1. Die untere Bestimmungsgrenze/Quantifikationsgrenze ist gleich dem Durchschnittswert des Leerwertes + 2-3 x SD (Standardabweichung = standard deviation SD) des Leerwertes.
2. Die biologische Bestimmungsgrenze ist der Durchschnittswert des Leerwertes + 2-3 SD der gespickten Probe.
3. Die funktionale Sensitivität ist der Durchschnittswert der gespikten Probe mit einem CV (Coefficient of variation) von 20%. Dies ist der niedrigste Schwellenwert, bei dem eine quantitative Information zuverlässig ist. Mehrere gespikte Proben müssen getestet werden, um eine gespikte Probe mit einem 20%igen CV zu bestimmen.

i. Auswahl von Qualitätskontroll-Richtlinien für die statistische Überwachung der Durchführung von Testverfahren (QC-Validierung)

i. Die Validierung der Qualitätskontrolle (QC) kann manuell unter Benutzung von normalisierten OpSpecs-Grafiken, dem EZRUNS Kalkulator (www.westgard.com) oder anderen Qualitätssicherungsprogrammen durchgeführt werden (Friedrichs 2005).

ii. Die QC-Validierung macht von den TEa-Spezifikationen (oder der dem klinischen Entscheidungsintervall) für den Test Gebrauch, zusammen mit CV (RE) und Bias (SE) welche aus den Replikations- und Methodenvergleichsexperimenten stammen, um Kontrollregeln zu bestimmen, die für die statistische QK angewandt werden können (Westgard 2006).

iii. Für die meisten automatisierten Methoden ist eine Fehlererkennungswahrscheinlichkeit von 90% und eine Wahrscheinlichkeit für eine falsche Zurückweisung von 5% ausreichend. Für extrem stabile Tests mit wenig bekannten Problemen kann eine Fehlererkennungswahrscheinlichkeit von 50% akzeptabel sein (QP15 Häufig gestellte Fragen über Qualitätsplanung. Abrufbar unter: www.westgard.com. zugegriffen am 10. November 2009).

iv. Unterschiedliche QC-Regeln werden möglicherweise für unterschiedliche Schwellwerte eines einzelnen Parameters erforderlich sein (mehrstufige QC). Zum Beispiel können striktere Mehrfachregel QCs erforderlich

sein, um einen Fehler bei niedrigeren Schwellwerten des Analyten im Vergleich zum höheren Schwellwert festzustellen.

v. Die Übernahme einer neuen Methode oder Kalibrierung/Instandhaltung einer Methode kann andere (striktere) QC-Regeln erfordern als solche die bei der routinemäßigen Verwendung der Methode verwendet werden. Dies wird als mehrstufige QC bezeichnet.

2.1.3. Analyseinstrumente

a. **Leistungsfähigkeit eines Instrumentes:** Die verwendeten Geräteausstattungen und Methoden müssen imstande sein, Testergebnisse innerhalb der vom Labor festgesetzten Leistungsmerkmale zu liefern (Linnet 2006). Diese schließen mit ein:

i. Analytischer Bereich einschließlich Nachweisgrenze und Linearität

ii. Präzision

iii. Richtigkeit

iv. Analytische Spezifizität: Messung der Zielsubstanz. Dies sollte eine Schätzung ermöglichen und jegliche Störsubstanzen definieren. Da Interferenzen nicht immer vermieden werden können, sollte erwogen werden, Interferogramme zu entwickeln, um die Auswirkungen von hinzugefügten Lipiden, Bilirubin und Hämoglobin auf die Testergebnisse zu untersuchen. Interferenzen sind spezies-spezifisch, daher werden Interferogramme idealerweise für jedem zu testenden Parameter und jeder zu testenden Tierart entwickelt.

v. Analytische Sensitivität

vi. Zusätzliche Punkte, welche zu berücksichtigen sind

1. Geräte mit anpassbaren Einstellungen für verschiedene Substanzen und/oder Tierarten sollten sorgfältig auf ihre Complience kontrolliert werden.
2. Vom Labor und Hersteller definierte Leistungsmerkmale sollten verglichen und Anpassungen durchgeführt werden, wenn diese als notwendig erachtet werden.
3. Es soll sichergestellt werden, dass tierartliche Unterschiede berücksichtigt werden; üblicherweise assistieren Techniker des Geräteherstellers bei diesem Aspekt der Geräteeinstellung.

b. **Funktionsüberprüfungen:**

i. Geeignete Funktionsprüfungen von kritischen Betriebseigenschaften sollten an allen Geräten durchgeführt werden (z.B. Streulicht, Nullabgleich, elektronische Werte, optische Ausrichtung, Überprüfungen des Hintergrunds, usw.)

ii. Vor der Testdurchführung sollte das Personal täglich oder pro Arbeitsschicht eine QC durchführen und/oder jedes Gerät kalibrieren. Die Geräte sollten nach den Anleitungen des Herstellers bedient werden.

c. **Kalibrierung:**

i. Die Geräte sollten mindestens alle 6 Monate kalibriert werden. Häufigere Kalibrierungen können in folgenden Fällen erfolgen (Westgard 2008a):

1. Den Empfehlungen des Herstellers entsprechend
2. Im Anschluss an eine umfangreichere Wartung
3. Wenn sich die QC-Werte außerhalb der Grenzen bewegen oder eine Fehlersuche den entsprechenden Bedarf aufzeigt
4. Wenn die Arbeitslast, Leistungsfähigkeit oder Reagenzien-Stabilität häufigere Kalibrierung erfordert.

ii. Nach der Kalibrierung sollten Kontrollläufe entsprechend der Standardarbeitsanweisung durchgeführt werden.

2.1.4. **Fachwissen.** Das Laborpersonal sollte über profundes Fachwissen bezüglich der Intrumente und seiner Bedienung verfügen, einschließlich, jedoch nicht begrenzt auf folgende Themen:

a. Linearitätsunterschiede in Tier- verglichen zu humanmedizinischen Proben
b. Auswirkungen von Hämolyse, Lipämie, Ikterus, Karotinoiden (besonders bei Großtieren), und verschieden Antikoagulantien für jeden einzelnen Test
c. zu befundende Bereiche
d. Spezies- oder rassespezifische zu befundende Bereiche und Referenzintervalle
e. Zu erwartende physiologische Bereiche. Kriterien für Wiederholungsuntersuchungen können erstellt werden, die die wiederholte Analyse einer Probe einleiten. Die Kriterien, um einen Test zu wiederholen schließen jegliche Fehlermeldungen oder Flaggen des Gerätes mit ein, sowie solche Ergebnisse, die deutlich außerhalb der physiologischen Bereiche liegen. Für den letzteren Fall sollte die Verwendung von sogenannten „Panik-Werten“ in Betracht gezogen werden, die bereits im biochemischen Analyser vorprogrammiert sind. Die Wiederholung eines abnormalen Testergebnisses sollte dem Kunden als Teil des Ergebnisberichtes mitgeteilt werden.
f. Häufige Probleme, auf die bei tiermedizinischen Proben gestoßen wird und geeignete Schritte, die bei verschiedenen Fehlermeldungen und -codes eingeleitet werden müssen.
g. Regelmäßige Gerätewartung (täglich, wöchentlich, monatlich oder je nach Bedarf)

h. Ersatz von ungeeigneter oder fehlerhafter Ausrüstung
i. Problemlösungsverfahren (Fehlersuche)
j. Geeignete Verwendung von Kommentaren und tierartspezifischer Kriterien. Kommentare und tierartspezifische Kriterien können zum interpretativen Vorteil des Kunden definiert werden. Direkte Kommunikation mit den Kunden sollte auf qualifizierte Personen innerhalb des Unternehmens beschränkt sein, die eine Interpretation der Ergebnisse im Zusammenhang mit dem Vorbericht und vorangegangener Therapie liefern können.

2.1.5. **Qualitätskontrolle.** Kalibratoren und Kontrollmaterialien sollten in geeigneter Weise zusammengestellt werden, und ihre Verwendung sowie Häufigkeit sollten als Teil des Qualitätsplanes dokumentiert werden, um die Richtigkeit der Ergebnisse zu gewährleisten (Westgard 1998). Die Dokumentation und Einleitung angemessener Schritte sollten den Regeln und Strategien folgen, welche für die Analyse von QC-Parametern erstellt wurden. Diese können mit einschließen, dass Ergebnisse bestätigt werden und dass geeignete Tabellen, Grafiken und Dateneingabe verwendet werden, je nach Festlegung des Labors für jede Abteilung und/oder Gerätetyp. Eine Kommunikationsstruktur sollte implementiert werden, um die Laborleitung über QC-Probleme zu informieren. Probleme, die weitere Aufmerksamkeit erfordern, sollten an die zuständige Stelle innerhalb des Labors weitergeleitet werden. Ebenso sollten durchgeführte Maßnahmen werden, um deren Effektivität zu überprüfen.

a. Auswahl von QK-Richtlinien für die statistische Überwachung der Leistungsmerkmale von Testmethoden (QK-Validierung)

i. Die QC-Validierung kann manuell unter Verwendung von standardisierten OpSpecs-Grafiken, dem EZRUNS Rechner (www.westgard.com) oder anderweitigen Qualitätssicherungsprogrammen durchgeführt werden.

ii. Die QK-Validierung verwendet die TEa-Spezifikation (oder das klinische Entscheidungsintervall) für den jeweiligen Test mit CV (RE) und Bias (SE), basierend auf den Wiederholbarkeits- und Methodenvergleichsstudien, um mögliche Kontroll-Richtlinien zu definieren, die für die statistische QK angewandt werden können.

iii. Für die meisten automatisierten Methoden ist eine Wahrscheinlichkeit für eine 90% Fehlerfeststellung und eine Wahrscheinlichkeit für eine falsche Rückweisung von <5% ausreichend. Für sehr stabile Tests mit wenig zu erwartenden Problemen kann eine Wahrscheinlichkeit der Fehlererkennung von bis zu 50% akzeptabel sein.

iv. Unterschiedliche QC-Richtlinien können für verschiedene Stufen eines einzelnen Parameters erforderlich sein (mehrstufige QC). Zum Beispiel kann eventuell unter Umständen eine striktere Multiregel- QC notwendig sein, um Fehler bei niedrigeren Analytkonzentrationen zu ermitteln, verglichen mit solchen bei höheren Analytkonzentrationen.

v. Unterschiedliche QC-Richtlinien können während der Anpassung einer neuen Methode oder nach Kalibrierung und Wartung wünschenswert sein, verglichen zu solchen Richtlinien während der routinemäßigen Benutzung einer etablierten Methode (mehrstufige QC). Die zuvor genannten QC-Richtlinien sind typischerweise strikter als die zuletzt erwähnten.

b. **Reagenzien und Materialien** für die Testverfahren sollten mit dem Lieferdatum, dem Öffnungs- und Lagerungsdatum gekennzeichnet werden, je nach den Empfehlungen des Herstellers. Verfallsdaten sollten eingehalten werden. Verfallene Reagenzien sollten in geeigneter Weise entsorgt werden. Analytkonzentrationen in Kontrollmaterialien repräsentieren häufig niedrige und hohe Werte in Bezug auf menschliche Abweichungen unter Berücksichtigung von normalen Konzentrationen beim Menschen. Wenn pathologische Konzentrationen von Tierarten von diesen Bereichen bedeutend abweichen, kann es erforderlich sein, zusätzliche Kontrollmaterialien mit Bereichen ähnlich veterinmedizinischer pathologischer Konzentrationen oder Aktivitäten mit einzuschließen.

c. **Die Auswahl der Kontroll-Anzahl** wird zum Teil von den Leistungsmerkmalen der Geräteausstattung abhängen und ist Teil des Ablaufs der QK-Validierung. Traditionellerweise werden im Allgemeinen 2 bis 3 Kontrollmaterialen verwendet, jedoch können zusätzliche QC-Datenpunkte erforderlich sein, um eine hohe Wahrscheinlichkeit der Fehlererkennung und eine niedrige Wahrscheinlichkeit der falschen Zurückweisung bei einigen Tests sicherzustellen.

d. **Ein Durchlauf von maximal 24 Stunden** wird empfohlen, sofern der Gerätehersteller nicht häufigere Kontrolldurchläufe empfiehlt.

e. **Überprüfung der Reagenzien-Stabilität** über eine „Durchlauf-Länge“ sollte während der Methoden-Validierung durchgeführt werden, indem Kontrollmaterialien während der gesamten Laufdauer mehrere Male getestet werden und indem die resultierenden Duchschnittswerte und SD mit den Ergebnissen von „Replikations“-Präzisionsexperimente verglichen werden.

f. Erstellung der QK-Häufigkeit auf Basis von folgenden Überlegungen:

i. Testhäufigkeit und Durchsatz (Anzahl der Tests, die während jedem Durchlauf oder täglich durchgeführt werden)

ii. Die Intensität, mit der Methoden- und Qualitätsanforderungen für den Test von präzisen technischen Leistungsmerkmalen abhängt

iii. Parameter- und Reagenzien-Stabilität

iv. Häufigkeit von QC-Fehlern

v. Ausbildung und Erfahrung des Personals

vi. Kosten der QK (erhöhte Häufigkeit trägt zu den Kosten pro Test bei)

g. QC-Parameter

i. Für einen akzeptablen Leistungsbereich von QC-Materialien sollten Labors entweder eigene Kriterien aufstellen oder die Kriterien des Herstellers verifizieren. Durchschnittswert, SD und CV sollten mit einem Minimum von 20 Messungen berechnet werden. Es wird empfohlen, Kontrollsubstanzen derselben Charge zu verwenden.

ii. Kontrollen sollten in derselben Weise wie Patientenproben getestet werden.

iii. Nach dem Wechsel der Charge eines Reagenz sollte mindestens 1 Level an Kontrollmaterial überprüft werden.

iv. Es sollte ein Mechanismus vorhanden sein, um zu überprüfen, ob das Personal die Richtlinien und Vorgehensweisen korrekterweise befolgt.

v. Die Anwendung des mehrstufigen Westgard-Verfahrens oder anderweitige Regeln basierend auf QC-Validierungen wird empfohlen.

vi. Kumulierte QC-Ergebnisse sollten systematisch und in regelmäßigen Abständen überprüft werden, zum Beispiel durch die Verwendung von Levy-Jennings Diagrammen. Es solltenangemessene Handlungen unternommen werden, wenn die QC-Ergebnisse die Grenzen übersteigen oder ungewünschte Verläufe demonstrieren.

vii. Richtlinien und Vorgehensweisen sollten in einem Verfahrens-Handbuch zusammengefasst sein. Jährliche (oder häufigere) Überprüfungen von Richtlinien und Vorgehensweisen sollten von den Angestellten dokumentiert werden.

viii. QC-Protokolle sollten häufig überprüft werden, um sicherzustellen, dass angemessene Maßnahmen ergriffen werden, wenn die QK-Ergebnisse nicht den Anforderungen der Akzeptierbarkeit entsprechen. Korrigierende Handlungen sollten dem Laborpersonal vorgegeben werden.

ix. Kontrollsubstanzen (bevorzugterweise derselben Chargennummer) sollten kommerziell beschafft werden. Falls Kalibratoren als Kontrollen verwendet werden, sind unterschiedliche Chargen für jede Aufgabe zu verwenden. Falls gepaarte Patientenproben verwendet werden, erstellen Sie den

Durchschnittswert aller Proben (Minimum n = 10 zur Erstellung eines Durchschnittswertes).

x. Überwachen Sie die Ergebnisse von klinischen Proben auf verschiedene Fehlerquellen hin unter Verwendung von Parametern wie Anionen-Differenz, Vergleich von Testergebnissen mit vorherigen Einsendungen desselben Patienten (delta-Checks), und Untersuchung von stark abweichenden Ergebnissen (Grenzwertprüfungen).

xi. Die Anweisungen des Herstellers für Routine-Wartungen (täglich, wöchentlich, monatlich) und Kalibrierungen sollten befolgt werden, es sei denn die Labors haben diese für ihren eigenen Bedarf angepasst und in entsprechenden Anweisungen dokumentiert. Ein Protokoll zur Geräte-Wartung, Kalibrierung oder Reparatur sollte im Labor oder der Messtechnik-Abteilung vorrätig gehalten werden.

2.1.6. **Verfahrens-Leitfaden**. Siehe Westgard und Klee für eine Übersicht zum empfohlenen Inhalt eines Verfahrens-Leitfadens (Westgard 2006). Protokolle können entweder als Kopien in Handbüchern und/oder gespeichert im Computer vorliegen. Alle derzeitig verwendeten Verfahren sollten in dem Verfahrens-Leitfaden aufgeführt sein und jedem Angestellten, der diesen Test durchführt, leicht zugänglich sein. Änderungen sollten von einer/mehreren kenntlich gemachten Person/en durchgeführt werden. Die Gliederung eines Leitfadens hängt von der Größe, dem Bedarf und den Anforderungen der Einrichtung ab. Bestimmte beglaubigende Organisationen haben möglicherweise spezifische Anforderungen und bestimmte Standardabläufe (SOPs) werden von diesen empfohlen. Die meisten Laborverfahren sollten mit den hier aufgeführten Kategorien angemessen abgedeckt sein. Mit dem Abschluss des Trainings von neuem Laborpersonal sollte eine Prüfliste geführt werden, um die Kompetenz der Testdurchführung und das Fachwissen von, den Tests zugehörigen Aspekten, zu dokumentieren. Wenn es zur Überarbeitung des Verfahrens-Protokolls kommt, sollte eine Besprechung mit dem betroffenen Personal stattfinden, um sicherzustellen, dass alle Beteiligten mit den überarbeiteten Verfahrensweisen vertraut sind.

a. Index

b. Allgemeine Information

i. Allgemeine Strategien und Testverfahren

ii. Qualitätssicherungsinformation

iii. Länge der Probenlagerung und -entsorgung

iv. Lagerung und Entsorgung von Originaldaten

v. Routinemässige Aussendungen

1. Information über die Testeinrichtung
2. Anforderungen an die Proben
3. Richtlinien für Aussendungen
4. Umlaufzeit

c. Standardabläufe (SOPs) für jedes Verfahren. Die Menge an Informationen in einer SOP variiert möglicherweise, doch die folgenden Themen werden empfohlen (Westgard 2006).

i. Titel (einschließlich des Datums oder der Nummer der Ausgabe)

ii. Zweck und Anwendung des Testverfahrens

iii. Prinzipien des Tests

iv. Handhabung der Proben

1. Vorbereitung des Patienten (z.B. spezies-spezifische Information)
2. Probenentnahme, -handhabung und -verarbeitung (z.B. Minimum an Volumen)
3. Kriterien für die Zurückweisung von Proben

v. Betriebliche Vorsichtsmaßnahmen und Anwendungsgrenzen

1. Gefahren
2. Interferenzen mit der verwendeten Methode
   - Hämolyse, Ikterus, Lipämie
   - Antikoagulantien
   - Medikamente etc
3. Berichtenswerte Reichweite
4. Sensitivität und Spezifizität falls zutreffend

vi. Reagenzien

1. Lagerungsort und -bedingungen
2. Vorbereitung
3. Offene Lagerbeständigkeit
4. Hersteller (z.B. Inhaltsstoffe)

vii. Ausrüstung und Zubehör

1. Für die Testdurchführung notwendige Ausrüstung oder Werkzeuge
2. Ort des Zubehörs
3. Vorzunehmende Maßnahmen bei Systemausfall (siehe Abschnitt zu Aussendungen ggf. sollten zusätzliche Informationen zur Verfügung gestellt werden)

viii. Vorgehensweisen der Kalibrierung und Qualitätskontrolle

1. Materialien
2. Häufigkeit

3. Interpretation (wann muss nachgeprüft, wiederholt oder Fehlersuche durchgeführt werden etc)

ix. Vorgehensweisen (Schritt-für-Schritt Anleitungen)

x. Referenzintervalle für jede entsprechende Tierart

xi. Interpretation und Berichterstattung: kritische Werte (empfohlene Handlungen)

1. Kommunikationskette
   - hauseigenes Laborpersonal
   - Informationen zu technischen Vertretern
2. Vorgehensweise zur Fehlersuche
   - QC-Überprüfung
   - Wiederholungslauf
   - Verdünnungen (geeignete Verdünnungslösung)

xii. Literaturnachweise

xiii. Dokumentation

1. Name, Datum und Unterschrift des Erstellers (Datum der Inkraftsetzung falls es sich vom Erstellungsdatum unterscheidet)
2. Name, Datum und Unterschrift des Überprüfers (falls zutreffend)
3. Trainingsprotokoll

xiv. Zusätze

1. Protokolle und Arbeitsblätter
   - Überwachungs- und Fehlersuche-Protokoll
   - Ergbnisprotokoll
2. Packungsbeilagen (Ein Großteil der oben aufgeführten Informationen kann möglicherweise direkt aus der Packungsbeilage entnommen werden. In dem Falle kann die SOP auf die betreffenden Abschnitte der Beilage hinweisen).
3. „Spickzettel“
   - Schneller Hinweis-Ratgeber
   - Titel und Version des Testverfahrens

2.1.7. Vergleich von Testergebnissen.

Falls der gleiche Test im Labor mit mehreren Methoden, an mehr als einer Stelle, oder von einem Vertragslabor durchgeführt wird, sollten Vergleichsdurchläufe mindestens jährlich vorgenommen werden, um Zusammenhänge zwischen Methoden und Teststellen zu definieren. Die derzeitigen Richtlinien zum Methodenvergleich werden gegenwärtig überarbeitet. Wir verweisen auf die ASVCP Webseite.

Die folgenden Schritte sollten mit einbezogen werden:

a. Ein Minimum an 20 Proben innerhalb des analytischen Bereichs sollten verglichen werden.
   i. Die Daten sollten in einem x-y-Diagramm eingetragen werden.
   ii. Die Steigung und der Schnittpunkt sind mit der Methode der kleinsten Quadrate zu berechnen
   iii. Die Verwendung eines labordiagnostischen Statistik-Software-Programms, wie zum Beispiel EP-Evaluator, lässt den Methodenvergleich durch Benutzung von festgelegten analytischen Reichweiten und CLIA-akzeptabler Ziele für Leistungsmerkmale zu.
b. Die Laborleitung oder qualifiziertes Personal sollte akzeptable Leistungsgrenzen definieren.
c. Falls individuell durchgeführte Testergebnisse vom gleichen Patienten oder Materialien nicht miteinander übereinstimmen (z.B. Blutharnstoff/ Kreatinin, Elektrolyt-Gleichgewicht), sollte die Ursache ermittelt, der Sachverhalt dokumentiert und korrigierende Handlungen durchgeführt werden.
d. Enzym-Verifizierungen sollten mindestens alle 6 Monate (halbjährlich) zwischen Analysegeräten durchgeführt werden, sowie nach jeder umfangreicheren technischen Wartung oder anderen Problemen. Die Enzym-Verifizierung wird durch die Durchführung einer Linearitätsstudie und Vergleich der Testergebnisse zwischen Analysegeräten durch lineare Regression vervollständigt.

2.2. Klinische Chemie

2.2.1. Überwachung

a. Interne Überwachung sollte folgende Punkte beinhalten.

i. Wasserqualität (je nach Angaben bei Geräte und Assay)
ii. Stabilität von Elektrizität (je nach Gerät)
iii. Temperaturen von Wasserbad, Kühl- und Gefrierschrank (Empfehlung: täglich). Größere Geräte können mit einem Alarmsystem verbunden werden, um die Benutzer zu alarmieren, wenn sich die Temperaturen außerhalb eines definierten Bereiches bewegen.
iv. Regelmäßige Kalibrierung von analytischen Waagen und Pipetten (Empfehlung: jährlich).
v. Auf dem neuesten Stand gehaltene SOPs mit deutlich sichtbarem Datum der ursprünglichen Inkraftsetzung und Versionsummer der Überarbeitung sollten zur Verfügung stehen. Ein System sollte vorhanden sein, das sicherstellt, dass ausschließlich aktualisierte Kopien verwendet werden und dass veraltete

Versionen archiviert werden und nicht versehentlichen in Gebrauch oder in Umlauf gesetzt werden können.

vi. Angemessene Lagerung, Bearbeitung und Pflege des Lagerbestands.

vii. Instandhaltung eines Protokolls, das verfahrenstechnische Veränderungen, Probleme mit Testdurchführung oder Geräten, sowie Maßnahmen zur Problemlösung enthält. Alle Einträge sollten vom Laborpersonal deutlich mit Datum und Unterschrift versehen werden. Diese Tätigkeit kann von einer mit Messungen befassten Abteilung- durchgeführt und elektronisch instandgehalten werden, um leichten Zugang während einer behördlichen oder Qualitätssicherungs-Inspektion zu gewährleisten.

b. Externe Überwachung – siehe Allgemeine Empfehlungen

i. Methodenvalidierung – siehe Allgemeine Empfehlungen

ii. Geräte – siehe Allgemeine Empfehlungen

iii. Fachwissen – siehe Allgemeine Empfehlungen

iv. Qualitätskontrolle – siehe Allgemeine Empfehlungen

v. Verfahrens-Leitfaden – siehe Allgemeine Empfehlungen

vi. Testvergleich – siehe Allgemeine Empfehlungen

vii. Bestimmung von Außer-Haus-Tests – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.3. Hämatologie

2.3.1. **Überwachung** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.3.2. **Methodenvalidierung** – siehe Allgemeine Empfehlungen. Nicht alle im Abschnitt 2.1.2. aufgeführten Experimente zur Methodenvalidierung sind für die Evaluierung von automatisierten Blutanalysegeräten uneingeschränkt anwendbar. Die Experimente zur Methodenvalidierung sollten je nach Bedarf ausgewählt und angepasst werden, um sicherzustellen, dass neue Testmethoden/Analysegeräte zufriedenstellend funktionieren, so dass sie den Anforderungen des Labors und den Bestimmungen des Herstellers entsprechen.

2.3.3. **Geräte** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.3.4. **Fachwissen** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.3.5. **Qualitätskontrolle für die Hämatologie** – siehe ebenso Allgemeine Empfehlungen

a. Automatisierte Assays, berechnete Indizes und Mikroskopie

i. Erythrozytenzahl (RBC)

ii. Hämoglobinkonzentration

iii. Hämatokrit

iv. Erythrozytenmorphologie einschliesslich RDW, HDW, MCV, MCH/*CH, und MCHC/*CHCM (*direkte Laser-Messung mit Advia Hämatologie-Analysegerät)

v. Absolute Leukozytenzahl (WBC)

vi. Leukozytendifferenzialzählungen (mikroskopisch und automatisch)

vii. Erythrozyten- und Leukozytenmorphologie (mikroskopisch)
viii. Thrombozytenzahl
ix. Thrombozytenindizes (einschließlich MPV und PCT)
x. Retikulozytenzahl (mikroskopisch und automatisch)
xi. Blutausstriche sollten vorbereitet, gefärbt und dem Labordiagnostiker/ klinischen Pathologen auf Wunsch zur Verfügung stehen

b. Empfehlungen

i. Automatische Differenzialblutbilder sollten durch manuelle (mikroskopische) Evaluierung eines Blutausstriches überprüft werden. Es sollten Kriterien für solche Situationen aufgestellt werden, die eine mikroskopische Untersuchung des Blutausstriches erfordern (z.B. absolute Leukozytenzahl >20,000/µl)

ii. Manuelle Zellzählungen: Zellzählungen, die manuell mit einer Zählkammer durchgeführt werden, sollten zweifach ausgezählt werden. Falls die Zählungen mehr als >10% voneinander abweichen, sollten die Zählkammern neu beschickt und erneut im Duplikat ausgezählt werden. Falls eine Kontrolle für manuelle Leukozyten- , Erythrozyten- oder Thrombozytenzählungen verwendet wird, sollte jedes Mal, wenn diese Methode verwendet wird oder einmal pro Arbeitsschicht entweder eine Stufe an Testmaterial oder verfahrenstechnischer Kontrolle (im folgenden definiert) analysiert werden.

Eine verfahrenstechnische Kontrolle wird als eine der folgenden definiert:

a. Duplizierte Verdünnungen einer Testkontrolle oder einer zuvor getesteten Patientenprobe. Die Ergebnisse können mit zuvor definierten akzeptablen Grenzen für Duplikats-Unterschiede verglichen werden. (Dies ist die einzige akzeptable verfahrenstechnische Kontrolle für manuelle Erythrozytenzählungen).

b. Leukozyten- und Thrombozytenzählungen können mit einem geschätzten Wert eines Blutausstriches verglichen werden.

iii. Neu-Methylenblau-gefärbte [in Deutschsprachingen Ländern wird eher Brilliantkresylviollett eingesetzt] Ausstriche können für eine mikroskopische Retikulozytenzählung verwendet werden. Falls die Zählungen im Duplikat durchgeführt werden (2 Ausstriche), sollten die Ergebnisse nicht mehr als 10% voneinander abweichen.

iv. Automatische Retikulozytenzählungen sollten mit dem auf dem Ausstrich beobachteten Anteil an polychromatophilen Erythrozyten übereinstimmen.

v. Der zentrifugierte Hämatokrit (PCV) sollte ungefähr dem Hämatokrit nahekommen, der mit Hilfe des automatischen Blutanalysegerätes unter Verwendung von MCV und Erythrozytenanzahl berechnet wurde. Das Labor sollte die zwischen Tierarten varriierende maximal akzeptable Differenz festlegen.

vi. Die Mean cell hemoglobin concentration (MCHC) überschreitet unter Umständen das obere Referenzintervall, wenn Hämolyse (pathologisch oder in vitro), Lipämie oder Heinzkörperchen in der Probe vorhanden sind. Falls keiner dieser Zustände vorliegt, zeigt ein hoher MCHC wahrscheinlich einen Gerätefehler an.

2.3.6. **Verfahrens-Leitfaden** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.3.7. **Testvergleich** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.3.8. **Durchführung von Ausser-Haus-Tests** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.4. Manuelle Untersuchung der Hämatologievon Nicht-Säugetieren

2.4.1. **Überwachung.** Die interne Überwachung sollte folgendes beinhalten: Überwachung der Reagenz-Zubereitung für die Zellzählungs-Verdünnungslösung (Gütegrad des Wassers für Reagentien, Nachprüfung der Qualität der neuen Charge im Vergleich zur vorherigen)

2.4.2. **Methodenvalidierung** – siehe ebenso Allgemeine Empfehlungen. Die Untersuchenden sollten fachkundig sein in Exoten-Hämatologie, jedoch sind anderweitige Standard-Methodenvalidierungstests durchzuführen. Nicht unbedingt alle im Abschnitt 2.1.2. aufgeführten Methodenvalidierungsexperimente sind für die Überprüfung der Methoden für die manuelle Exoten-Hämatologie anwendbar. Methodenvalidierungstests sollten ausgewählt oder je nach Notwendigkeit angepasst werden, um sicherzustellen, dass neue Methoden zufriedenstellend funktionieren und so den Anforderungen des Labors und den Vorschriften des Herstellers entsprechen.

2.4.3. **Geräte** – siehe ebenso Allgemeine Empfehlungen. Die für das Hämatologie-Verfahren verwendete Ausrüstung (z.B. Zählkammern, kalibrierte Deckgläser für die Zählkammern, Handzähler, kalibrierte Pipetten, Differenzierbänke) sollte in gutem Zustand sein. Routinemäßige Überwachung und regelmäßige Wartung jedes Gegenstandes der Ausrüstung (z.B. jährliche Kalibrierung von Pipetten und Ausgleichsgewichten) sollten durchgeführt und dokumentiert werden. Protokolle

von Wartungen, sowie Fehlfunktionen und Reparaturen sollten angefertigt werden. Abbott Diagnostics, Inc. (Abbott Park, Illinois, USA) hat automatisierte Zellzählungen von einigen Nicht-Säugetierarten mit automatisierten Blutanalysegeräten, wie Cell-Dyn 3500 oder höher, validiert und unterstützt diese. Die Validierung wurde in den Sea World Labors durchgeführt.

2.4.4. **Fachwissen**. Das Laborpersonal sollte in der Zellidentifikation für die getesteten Tierarten geschult sein. Es ist wichtig, dass ein umfassendes Fachwissen der tierartlichen Abweichungen bei Verwendung von Durchflusszytometrie vorhanden ist, wenn die Überprüfung durch manuelle Methoden erforderlich ist.

2.4.5. **Qualitätskontrolle.** Manuelle Leukozytenzählungen unter Verwendung von Zählkammern sind ungenau und haben Variationskoeffizienten, die sich zwischen 20 und 40% bewegen (Schalm, Harr et al. 2005); daher können die Umsetzung von Qualitätskontrolle und statistischer Analyse in einer Signifikanz oder nicht-Signifikanz resultieren, die für den täglichen Betrieb nicht relevant ist. Methodenvalidierungsstudien, die für Hai-Arten von J. Arnold (2005) durchgeführt wurden, zeigten einen Variationskoeffizienten vergleichbar zur manuellen Hämatologie für humanmedizinische Leukozytenzählungen, wie sie in der B-D-Packungsbeilage für Unopette 365855 bei Verarbeitung der Probe innerhalb von 5 Stunden der Entnahme beschrieben wird.

a. **Reagenzien und Materialien.** Dokumentierte Protokolle für Zellzählungen umfassen die direkte Zählung unter Benutzung von Methyl-Violett (Natt & Herrick 1952) zur Bestimmung von absoluten Erythrozyten-, Leukozyten- und Thrombozytenzahlen, die direkte Zählung ohne Färbung (Hawkey 1988) sowie eine indirekte Methode mit Phloxine B Färbung (Campbell 1988) ausschließlich für die absolute Leukozytenzahl. Mit der letzteren Methode werden ausschließlich Zellen mit eosinophilen Granula gefärbt und die absolute Leukozytenzahl wird auf Basis der Prozentzahlen von Heterophilen und Eosinophilen des Differenzialblutbildes berechnet.

Die berichteten Methodenvalidierungsstudien zum Vergleich von direkten und indirekten Techniken sind widersprüchlich (Dein 1994; Arnold 1995) und bedürfen weiterer Überprüfung, vorzugsweise basierend auf den Richtlinien zur Methodenvalidierung von Westgard, mit einer eher repräsentativen Anzahl an Tierarten. Der Unterschied in den Ergebnissen beruht möglicherweise auf der Ungenauigkeit jeder Methode. Das Verdünnungsmittel, das von Natt und Herrick beschrieben wurde, kann im Labor hergestellt werden und eignet sich für alle Nicht-Säuger-Wirbeltiere; allerdings sind zusätzliche Salze erforderlich, wenn dieses Verdünnungsmittel für einige Meeresschildkröten- und

Knorpelfisch-Arten (Haie, Rochen) verwendet wird, um die Osmolalität der Stammlösung entsprechend anzupassen (Arnold 2005). Die Technik von Hawkey verwendet die Becton-Dickinson Leukozyten-Unopette. Die Methode von Campbell mit Verwendung von Phloxine B Verdünnung ist als Eosinophil Unopette 5877 nicht mehr erhältlich, jedoch können vergleichbare Verdünnungslösungen vom Anwender hergestellt werden.

b. **Derzeit sind kommerziell hergestellte Kontrollmaterialien für Blutzellzählungen von Nicht-Säugetieren nicht erhältlich. Verfahrenstechnische Kontrollen beinhalten folgende Punkte:**

i. Duplizierte Verdünnungen einer Patientenprobe, die innerhalb der akzeptablen Zeitgrenze für Probenstabilität durchgeführt wird.

ii. Leukozytenschätzung von einem Blutausstrich. Jede Institution sollte ein Protokoll zur Erzielung einer verlässlichen Methode für die Evaluierung der Genauigkeit von Zellkammer-Zählungen führen. Gesamtleukozytenzahlschätzungen könnten aufgrund einer morphologischen Ähnlichkeit Lymphozyten und Thrombozyten schwierig erscheinen, wenn diese bei niedrigerer Vergrößerung betrachtet werden, die typischerweise für Leukozytenschätzungen von Säugetier-Blutzellen verwendet werden.

c. **Die Befähigung des technischen Personals** sollten jährlich oder häufiger dokumentiert werden, je nach den Vorgaben durch die Institution. Die Prüfung sollte Vergleichszählungen von der gleichen Blutprobe für Gesamtzellzählungen und für Leukozyten-Differenzialblutbilder beinhalten. Die Probenauswahl sollte repräsentativ für die Patientenpopulation sein (Vögel, Reptilien, Knochen- oder Knorpelfische usw.). Die Zellkammerzählungen sollten bis zu 15% übereinstimmen und die Ergebnisse der Differenzialprozentzahlen für jede Zellart sollten innerhalb von 95% des Konfidenzintervalles liegen.

Direkte Zellzählungsmethode – Thrombozyten/Lymphozyten-Fehler. Es mag sich für neu trainierte Laborassistenten oder auch für erfahrene Assistenten bei der Zählung von bestimmten Tierarten als schwierig erweisen, zwischen Thrombozyten und Lymphozyten in der Zellkammer zu unterscheiden. Eine gute Qualitätskontrollprüfung ist die Zählung aller Nicht-Erythrozyten in den neun großen Quadraten der Zählkammer und die Berechnung der absoluten Zellzahl (dies ist nicht der absolute Wert und muss vom Differenzialblutbild korrigiert werden). Erstellen Sie das Differenzialblutbild zweimal, inklusive der Thrombozyten beim ersten Mal und exklusive der Thrombozyten beim zweiten Mal. Die Zahlen der letzteren Zählung werden als die eigentlichen

Differenzialzahlen berichtet. Verwenden Sie die Prozentzahl der Thrombozyten der ersten Zählung, berechnen Sie den absoluten Wert und subtrahieren Sie diese Zahl von der Gesamtzahl, um die Gesamtleukozytenzahl zu bestimmen.

Beispiel: Handzähler von der Zählkammer mit einer 1:100 Verdünnung = 750 Nicht-Erythrozyten Zellen; 750 x 1,1 x 100 = 82.500/µl für die gesamte Nicht-Erythrozyten Zählung. Das erste Differenzialblutbild = Monozyten (1%), Lymphozyten (9%), Heterophile (8%) und Thrombozyten (82%), damit ist der abolute Wert der Thrombozyten = 0,82 x 82.500 = 67.650. Die absolute Leukozytenzahl = 82.500 – 67.650 = 14.850/µl.

2.4.6. **Verfahrens-Leitfaden** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.4.7. **Testvergleich** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.4.8. **Durchführung von Ausser-Haus-Tests** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.5. Harnuntersuchung

2.5.1. **Überwachung** - siehe Allgemeine Empfehlungen

2.5.2. **Methodenvalidierung** – siehe Allgemeine Empfehlungen. Nicht alle der im Abschnitt 2.1.2. aufgeführten Methodenvalidierungstests treffen unbedingt auf die Bewertung der Urinuntersuchung zu. Methodenvalidierungstests sollten entsprechend ausgewählt und je nach Notwendigkeit angepasst werden, um sicherzustellen, dass neue Methoden/Analysegeräte zufriedenstellend funktionieren, um den Anforderungen des Labors und Bestimmungen des Herstellers zu entsprechen. Anwendbare Methodenvalidierungsverfahren können beinhalten, sind jedoch nicht begrenzt auf Vergleichsmethoden, Tests auf Störsubstanzen (besonders inwiefern die Urinfarbe die Fähigkeit zur visuellen oder automatisierten Urinteststreifenablesung beeinflusst), sowie möglicherweise Feststellungsgrenzen.

2.5.3. **Geräte** – siehe Allgemeine Empfehlungen. Die Geräte, die in der Urinuntersuchung angewandt werden sind begrenzt, doch schließt automatisierte Urinteststreifenlesegeräte mit ein. Automatisierte Urinteststreifenlesegeräte sollten je nach den Bestimmungen des Herstellers gewartet und bedient werden. Geeignete Funktionsüberprüfungen sollten je nach Bedarf durchgeführt werden, um eine angemessene Leistungsfähigkeit des Gerätes zu gewährleisten.

2.5.4. Fachwissen

a. Das Verständnis der Auswirkungen von Probenveränderungen auf Testparameter, z.B. von Hämoglobinurie auf die Proteinbestimmung.
b. Wissen über spezies-spezifische Kristallurien und zu erwartende Befunde.
c. Wissen über häufige Probleme, die mit tiermedizinischen Urinproben auftreten und möglicherweise zu fehlerhaften Ergebnissen führen können, z.B.

Auswirkungen von Konservierungsstoffen auf Testergebnisse, Urinproben die fälschlicherweise mit Einstellungen für Serumproben analysiert werden.

d. Wissen über die im Labor verwendete Urinteststreifen-Methodik sowie häufige Interferenzen für diese Methode.

e. Geeignete Verwendungen von Kriterien für Wiederholungstests: Festlegung durch das Labor und basierend auf klinischer Bedeutsamkeit der Testwerte, z.B. Kristallidentifikation, Bestätigung von Protein durch semi- oder analytische Quantifizierung, Bestätigung von Glukose. Tablettenmethoden können erforderlich sein, falls intensiv verfärbter Urin die Ablesung von Urinteststreifen beeinträchtigt. Auf dem Arbeitsblatt und dem Bericht sollten wiederholte Tests dokumentiert werdenoder korrigierte Berichte beigefügt werden (falls erforderlich).

2.5.5. Qualitätskontrolle

a. Assays

i. Physikalische Tests (Aussehen [Farbe, Klarheit], spezifisches Gewicht [Schätzung durch Refraktometrie])

ii. Chemische Tests

1. Urinteststreifen-Untersuchung
2. Bestätigungstests (Glucose [Tablette], Bilirubin [Tablette], Ketone [Puder oder Tablette], Sulfosalizylsäure-Präzipitations-Test für Protein)

b. **Qualitätskontrolle für Urinteststreifen und für spezifisches Gewicht von Urin.** Urinuntersuchungs-Kontrollmaterialien zum Testen der Genauigkeit von Urinteststreifen sind für menschlichen Urin erhältlich. Die Häufigkeit zur Testung der Qualitätskontrolle ist abhängig von der Anzahl der vom Labor durchgeführten Analysen und kann zwischen täglicher QK-Testung bis hin zur Testung der QK von jedem neu geöffneten Behälter mit Urinteststreifen variieren. Die Genauigkeit von Refraktometern sollte in regelmäßigen Intervallen unter Verwendung von destilliertem Wasser überprüft werden (SG 1.000) (George 2001).

c. Mikroskopische Urinsedimentuntersuchung: Standardisierung des Verfahrens

i. Die mikroskopische Sedimentuntersuchung von veterinärmedizinischen Urinproben bedarf einer gründlichen Ausbildung. Lehrbücher, Tabellen und Poster von geformten Bestandteilen im Urin von verschiedenen Tierarten sollten dem Untersuchenden zugänglich sein. Die Details zur Durchführung der Untersuchung und der zu berichtenden Ergebnisse können in der Standardarbeitsanweisung des Labors umrissen oder ausführlich beschrieben werden.

ii. Ein Standardvolumen an Urin wird für die Vorbereitung des Urinsedimentes verwendet (z.B. 5 oder 10 ml, abhängig von der Tierart und dem angeforderten Test). Konische Zentrifugationsröhrchen sollten bei einer niedrigen Umdrehungszahl zentrifugiert werden, z.B. 400 – 500 G für 5 Minuten. Eine hohe relative Zentrifugalkraft und zu lange Zentrifugationsdauer zerstören Zylinder und Zellbestandteile. Relative Zentrifugalkraft = 1.118×10^{-5} x Radius des Armes (cm) x Umdrehungen/min.

iii. Der Überstand wird durch Abgießen oder Pipettieren entfernt, damit ein konstantes Volumen an Überstand bei den Zellbestandteilen verbleibt (vorzugsweise ein Volumen von 0.5 ml). Die Zellbestandteile werden durch vorsichtiges Mischen wieder in der verbleibenden Flüssigkeit verteilt.

iv. Eine Färbung kann zu dem Sediment hinzugefügt werden, um die Identifizierung von Sedimentbestandteilen zu erleichtern. Eine einheitliche Anzahl an Tropfen sollte durch vorsichtiges Vermischen hinzugefügt werden. Eine zusätzliche Verdünnung von Zellbestandteilen durch das Volumen des Färbemittels sollte in die Endergebnisse mit einberechnet werden. Ersatzweise kann ein konstantes Volumen an Sediment durch Ersatz des Überstandvolumens durch Färbemittel aufrechterhalten werden.

v. Eine Pipette wird zur Übertragung von einem oder zwei Tropfen an Sediment auf den Objektträger verwendet, abhängig von der Deckglasgröße. Es ist wichtig, dass das verwendete Sedimentvolumen, die Anzahl an Sediment-Tropfen und die Deckglasgröße innerhalb des Labors konstant gehalten werden.

vi. Alternative Methoden für die standardisierte Untersuchung von Urinsediment sind verfügbar (z.B. volumetrische Zählgitter, automatisierte Methoden), jedoch werden diese nicht oft in der Veterinärmedizin verwendet. Die Einführung einer neuen Methodik sollte durch vorhergehende Methodenvalidierungsstudien überprüft werden.

d. Die mikroskopische Urinsedimentuntersuchung: Auszählung der Bestandteile

i. Die Sedimentbestandteile werden bei niedriger Vergrößerung (x100 oder low-power field; LPF) und nachfolgender trockener, höherer Vergrößerung (x400 oder high-power field; HPF) und selten in der Ölimmersions-Vergrößerung (x1000) untersucht. Verschiedene Formate zur Angabe von Grad und Mengen an geformten Bestandteilen werden verwendet. Absolute Zahlen haben viele Vorteile. Die niedrigen und höheren Mengen jedes Bestandteiles werden angegeben, die als Durchschnitt von 10 Feldern beobachtet werden. Ersatzweise kann auch ein 0 bis 3+ oder 0 bis 4+ Stufensystem verwendet werden, wenn klar formulierte Kriterien für die Untersuchenden festgelegt sind. Diese Information sollte den Klinikern oder Kunden zur Verfügung stehen. Das Standardverfahren

für die Urinsedimentuntersuchung sollte klar die Untersuchungsmethode und Angabe von Sedimentbestandteilen beschreiben.

ii. Die niedrige Vergrößerung (LPF) wird für die Auszählung von Zylindern benutzt. Zylinder werden nach Art und Anzahl pro LPF berichtet. Die niedrige Vergrößerung kann ebenso für die allgemeine Begutachtung der Verteilung von Kristallen, Epithelzellen und Hintergrundbestandteilen (Schleim, Spermien, Lipidtröpfchen, Hefen usw.) verwendet werden.

iii. Stärkere Vergrößerungen (HPF) werden für die Erfassung von Erythrozyten, Leukozyten und eventuellen Kristallen, Epithelzellen und Bakterien angewendet.

iv. Die Ölimmersionsvergrößerung kann für die Einschätzung von Konzentration und Morphologie von Bakterien und anderen zellulären Bestandteilen benutzt werden.

v. Die Beobachtung von Mikroorganismen (z.B. bakterielle Bazillen oder Kokken, Hefeorganismen) in ungefärbten oder gefärbten Feuchtpräparaten sollte mit einer schnell durchzuführenden Färbung oder Gram-Färbung unter Verwendung eines luftgetrockneten Objektträger-Ausstriches bestätigt werden. Dieser Objektträger kann direkt vom ursprünglichen Urin oder von konzentriertem Urinsediment angefertigt werden.

2.5.6. **Verfahrens-Leitfaden** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.5.7. **Testvergleich** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.5.8. **Durchführung von Ausser-Haus-Tests** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.6. Zytologie

2.6.1. **Überwachung.** Ausrüstung und Reagenzien für die Vorbereitung und Analyse von zytologischen Präparaten sollten im Einklang mit den Maßstäben guter Laborpraktiken gewartet und gepflegt werden, so wie es in den Abschnitten für die klinische Chemie und Hämatologie detailliert beschrieben ist.

2.6.2. **Methodenvalidierung** – siehe Allgemeine Empfehlungen. Nicht alle Methodenvalidierungsexperimente im Abschnitt 2.1.2. sind notwendigerweise auf die Evaluierung von zytologischen Methoden anwendbar. Methodenvalidierungsexperimente sollten je nach Notwendigkeit ausgewählt und angepasst werden, um sicherzustellen, dass neue Testverfahren/Analysegeräte zufriedenstellend funktionieren und den Anforderungen des Labors sowie den Bestimmungen des Herstellers entsprechen.

2.6.3. **Geräte** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.6.4. Fachwissen

a. Das technische Laborpersonal sollte darin geschult sein, Proben makroskopisch zu untersuchen (z.B. Flüssigkeitsfarbe, Klarheit), sowie alle relevanten Tests (Routine- und Spezialtests, z.B. Muzin-Präzipitationstest) durchzuführen.
b. Das Laborpersonal sollte über häufige Probleme, verbunden mit der Probenvorbereitung, Bescheid wissen und sollte mit Methoden zur Fehlerbehebung vertraut sein, um Probleme lösen zu können.
c. Die Person, die veterinärmedizinische Proben interpretiert, vorzugsweise der Labordiagnostiker, sollte eine entsprechende Ausbildung in Zytopathologie nachweisen können und über zytologische Befunde aller Tierarten sowie aller zytologischer Probenarten Bescheid wissen, die im Labor zu erwarten sind.
d. Es sollten geeignete Wege für eine zweite Meinung vorhanden sein, sowie Möglichkeiten zur zusätzlichen Überprüfung mit einem Zytopathologen, falls erforderlich oder erwünscht.
e. Es sollte danach gestrebt werden, die diagnostische Genauigkeit von zytologischen Interpretationen zusichern zu können. Dies kann folgende Punkte beinhalten, ist aber nicht nur begrenzt auf diese:

    i. Übereinstimmung von Befunden der histologischen und zusätzlichen zytologischen Proben.

    ii. Nachfolge-Information bezüglich des Zustandes des Patienten und/oder Ansprechen der Therapie

    iii. Peer-Review-Gutachten von ausgewählten Proben durch einen weiteren Zytologen/Zytopathologen, um festzustellen, ob Besonderheiten übersehen, über- oder unterinterpretiert wurden.

    iv. Übereinstimmung mit anderen diagnostischen Modalitäten, z.B. Röntgen, Ultraschall, mikrobiologische Kultur usw.

    1. Der Zytopathologe sollte fachkundig bezüglich zusätzlicher Testverfahren sein.
    2. Der Zytopathologe sollte technische Aspekte von Probenhandhabung und -bearbeitung mit dem Laborpersonal besprechen und bei Bedarf Beratung anbieten.
    3. Der Zytopathologe sollte in der Lage sein, mit dem Kunden wichtige präanalytische, analytische und postanalytische Einflussfaktoren mitzuteilen. Diese können beinhalten:
        - Information über die Eignung einer Probe
        - Vorgeschlagene Änderungen der Technik
        - Möglichkeiten für zusätzliche Tests
        - Diagnosen oder Differenzialdiagnosen

- Prognose oder Überwachung
- Behandlungsempfehlungen auf Basis von Erfahrung oder Fachwissen. Falls der Zytologe/Zytopathologe nicht in Therapiemöglichkeiten erfahren ist, sollte er/sie dem Kunden empfehlen, sich mit einem Spezialisten zu beraten.

2.6.5. **Qualitätskontrolle** – siehe Allgemeine Empfehlungen. Zytopathologen sind maßgebend für die Qualitätskontrolle, da sie die meisten oder alle zytologischen Proben und Präparate des Labors bearbeiten und von der Verlässlichkeit der Produkte für ihre Interpretationen und Empfehlungen abhängig sind. Daher ist ein gutes Arbeitsverhältnis zwischen dem Laborpersonal und den Zytopathologen entscheidend. Die Qualitätskontrolle sollte als Teil der Zytologiepräparateerstellung und Analyse für die verwendeten Arten der Proben, Färbungen und Testverfahren geeignet sein. Diese können mit jedem Labor, Art der zytologischen Verarbeitung und Vorlieben des Zytopathologen variieren. Die Gesamtzellzählungen der kernhaltigen Zellen von automatischen Analysegeräten oder der manuellen Methode (Zählkammer) sollte mit der Zelldichte auf dem Ausstrich übereinstimmen, falls direkte Ausstriche vorbereitet werden. Die Ausrüstung zur Bestimmung von absoluten Zellzahlen der kernhaltigen Zellen sollte ebenso überwacht werden wie für die Hämatologie (siehe Abschnitt Hämatologie).

2.6.6. **Verfahrens-Leitfaden** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.6.7. **Testvergleich** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.6.8. **Durchführung von Ausser-Haus-Tests** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.7. Blutgerinnung

2.7.1. **Überwachung** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.7.2. **Methodenvalidierung** –siehe Allgemeine Empfehlungen. Nicht alle der Methodenvalidierungsexperimente im Abschnitt 2.1.2. sind notwendigerweise auf die Evaluierung von Blutgerinnungsanalysegeräte anwendbar. Methodenvalidierungsexperimente sollten je nach Notwendigkeit ausgewählt und angepasst werden, um sicherzustellen, dass neue Testverfahren/Analysegeräte zufriedenstellend funktionieren und den Anforderungen des Labors sowie den Bestimmungen des Herstellers entsprechen.

2.7.3. **Geräte** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.7.4. **Fachwissen** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.7.5. **Qualitätskontrolle für die Blutgerinnung** – siehe ebenso Allgemeine Empfehlungen

a. Assays

i. Thrombozytenzählung und –schätzung

ii. Thrombozytenmorphologie

iii. Thrombozytenfunktionstests (Adhäsion, Aggregationen, Sekretion, PFA100, BMBT – buccal mucosal bleeding time [Wangenschleimhaut-Blutungszeit], DNA-Tests)

iv. Thrombozyten-Antikörper-Tests

v. aktivierte partielle Thromboplastin Zeit (aPPT)

vi. Prothrombin Zeit (PT)

vii. Thrombin Zeit (TT) oder Thrombin-Gerinnungszeit (TCT)

viii. Fibrinogen-Konzentration

ix. Gerinnungsfaktoren-Tests (funktionell, DNA)

x. Von Willebrand-Faktor-Tests (quantitativer ELISA, qualitative CBA, Multimerenanalyse, BMBT, relevante Thrombozytenfunktionstests, DNA-Mutations-spezifisch)

xi. Fibrin(ogen)spaltprodukte (FDP) and D-Dimer-Konzentrationen

xii. Antithrombin-Test

xiii. Protein C- und S- Assays

xiv. Thromboelastographie

xv. Thrombinbildungstest

xvi. Fibrinolyse-Tests

b. Empfehlungen

i. Individuelle Labors sollten entsprechende Stundenzahlen und/oder Arbeitsschichten für die Durchführung von Blutgerinnungstests festlegen. Thrombelastographie-Studien sollten vor der Analyse vorbereitet werden.

ii. Handgeräte sollten entsprechend der Empfehlungen des Herstellers regelmäßig kalibriert werden. Falls eine elektronische Qualitätskontrolle verfügbar ist, sollte sie nach den Bestimmungen des Herstellers durchgeführt werden. Eine externe Qualitätskontrolle ist empfehlenswert bei Änderung der Chargennummer des Reagenz, Laufrades usw., einer Veränderung oder Schaden am Gerät, oder bei anderen klinischen Bedenken. Für Tischgeräte sollte mindestens 1 Stufe an Kontrollmaterial in jeder Arbeitsschicht überprüft werden, falls ein Blutgerinnungsprofil angefordert ist. Dies kann vor oder während der Testung von Patientenproben durchgeführt werden.

iii. Patienten- und Kontrollproben sollten im Duplikat getestet werden.

iv. Die Daten werden in % von gepaarten Proben ausgedrückt; Intervalle stehen meist zur Verfügung und % der Abweichung der Kontrolle wird verwendet.

2.7.6. **Verfahrens-Leitfaden** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.7.7. **Testvergleich** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.7.8. **Durchführung von Ausser-Haus-Tests** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.8. Kreuzprobe

2.8.1. **Überwachung** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.8.2. **Methodenvalidierung** – siehe Allgemeine Empfehlungen. Nicht alle Methodenvalidierungsexperimente im Abschnitt 2.1.2. sind notwendigerweise auf die Evaluierung von Kreuztestmethoden anwendbar. Methodenvalidierungsexperimente sollten je nach Notwendigkeit ausgewählt und angepasst werden, um sicherzustellen, dass neue Testverfahren/Analysegeräte zufriedenstellend funktionieren und den Anforderungen des Labors sowie den Bestimmungen des Herstellers entsprechen.

2.8.3. **Geräte** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.8.4. **Fachwissen** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.8.5. **Qualitätskontrolle** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

a. Assays

i. Ein großer Kreuztest besteht in der Reaktion von Patientenserum/-plasma mit einer Suspension von Spender-Erythrozyten in phys. Kochsalzlösung.

ii. Ein kleiner Kreuztest, der durchführbar ist, wenn Vollblut des Spenders vorliegt, besteht aus der Reaktion einer Suspension von Patienten-Erythrozyten in phys. Kochsalzlösung mit Spenderserum oder -plasma.

b. Empfehlungen

i. Falls Serum für den Kreuztest verwendet wird, sollte dieses nach Gerinnung sobald wie möglich von den Erythrozyten getrennt werden. Die Proben sollten auf Hämolyse untersucht und entsprechend eingestuft werden, mit 1+ Hämolyse als mild und 4+ Hämolyse als hochgradig. Serum- (oder Plasma-) Proben mit 3+ oder 4+ Hämolyse sollten nicht angenommen werden, wobei strengere Rückweisungskriterien im Sinne von 1+ Hämolyse verwendet werden können. Hämolysierte Sera oder Plasma können eine inkompatible hämolytische Reaktion kaschieren (Lippi 2006; Giger, persönliche Kommunikation).

ii. Führen Sie Patienten- und Spender-Autokontrollen durch, um sicherzustellen, dass Reagenzien, wie z.B. Verdünnungsmittel, und Ausrüstung entsprechend funktionieren. Autokontrollen sollten als Parallelen mit und identisch zu den großen und kleinen Kreuztestproben gehandhabt werden.

1. Patienten-Autokontrollen bestehen aus aufgetrenntem Patientenserum/-plasma und einer Kochsalzsuspension mit gewaschenen Erythrozyten des Patienten.
2. Wenn Vollblut des Spenders vorliegt, dann besteht die Spender-Autokontrolle aus abgetrenntem Spenderserum/-plasma und einer Kochsalzsuspension von gewaschenen Erythrozyten des Spenders.

iii. Vermeiden Sie übermäßiges Schütteln und Klopfen, da dadurch möglicherweise falsch negative Ergebnisse durch Zerreißen von zerbrechlichen Aggregaten erzeugt werden können.

iv. Starke Rouleaux-Bildung kann eine echte Agglutination vortäuschen. Eine Verdünnung mit phys. Kochsalzlösung kann verwendet werden, um eine Rouleaux-Bildung aufzulösen.

v. Falsch positive Ergebnisse können sekundär durch unzureichendes Waschen entstehen.

vi. Da sehr kleine Fibringerinnsel im Plasma möglicherweise Pseudo-Agglutination verursachen können, ist es möglich, dass falsch positive Ergebnisse bei der Durchführung von Kreuztestreaktionen entstehen können.

vii. Falsch negative Ergebnisse können sekundär entstehen, wenn Erythrozytensuspensionen zu sehr verdünnt oder zu konzentriert sind.

2.8.6. **Verfahrens-Leitfaden** – siehe Allgemeine Empfehlungen. Verfahren für Kreuztests können zwischen Labors und Tierarten variieren. Spezielle Protokoll-Empfehlungen gehen über diese Richtlinien hinaus. Die Erstellung von Kreuztestverfahren oder deren Aneignung in einem vertrauten Labor werden empfohlen.

2.8.7. **Testvergleich** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.8.8. **Durchführung von Ausser-Haus-Tests** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.9. Radioimmuno-Assay (RIA)

2.9.1. **Gesetzliche Regelungen für RIA.** Gesetzliche Regelungen und Lizenzbestimmungen können zwischen Stadt, Bundesland, und Land variieren. Im Allgemeinen sind minimale Anforderungen der sicheren Handhabung von Radioisotopen vorgeschrieben. Die Bestimmungen beinhalten Personal-Sicherheitstraining, die Überwachung von radioaktiven Isotopen, angemessene Entsorgung von Radioisotopen und periodische Inspektion. Eine Lizensierung wird für die Anschaffung von radioaktiven Isotopen angefordert. Ein Labor, das an der Durchführung von RIAs interessiert ist, sollte vor der Einführung dieser Testverfahren ermitteln, ob es diesen Standards entspricht und demzufolge eine Zulassung erwerben kann.

2.9.2. **Überwachung** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.9.3. **Methodenvalidierung.** Jeder RIA sollte für die Tierart, für die er verwendet wird, validiert werden. Die Validierung sollte eine der im Folgenden aufgeführten Methoden beinhalten.

a. Publikationen in Peer-Review-begutachteten veterinärmedizinischen Fachzeitschriften von speziellem Interesse (falls verfügbar) sollten nachgelesen werden. Es ist keine gute Vorgehensweise, sich alleine auf die

Testung durch den Hersteller zu verlassen. Der Test sollte unabhängig davon validiert werden.

b. Falls der Test nicht durch unabhängige Validierung überprüft werden kann, dann ist die folgende minimale Überprüfung notwendig:

i. **Kurzzeit-Replikationsstudie** (Wiederholbarkeit):– ein Minimum an 10 Datenpunkten. 20 Datenpunkte können die Genauigkeit der Schätzung erhöhen.

ii. **Langzeit-Replikationsstudie** (Genauigkeit) – ein Minimum an 10 Datenpunkten. 20 Datenpunkte können die Genauigkeit der Schätzung erhöhen.

iii. **Korrekturverfahren** – Verwenden Sie eine gereinigte natürliche Substanz für jede Tierart, wenn auch immer möglich. Die Korrektur sollte unter Verwendung von hohen und niedrigen Konzentrationen durchgeführt werden.

iv. **Überprüfung auf Störsubstanzen**, einschließlich Hämolyse, Lipämie, Bilirubinämie, Medikamenten-Wechselwirkungen usw.

v. **Parallelität** – Verdünnungen und Details der Linearität.

vi. **Referenzintervalle** sollten für jeden Test aufgestellt und aufrecht erhalten werden. Wir verweisen auf die ASVCP Richtlinien für Referenzintervalle und Entscheidungs-Schwellenwerte.

vii. **Standardkurven** sind für jeden Test notwendig. Einige Gammazähler können Kurven abspeichern. Falls dies in die Routinetestung mit eingebaut ist, sollte eine Validierung des Testverfahrens vorhanden sein.

2.9.4. **Geräte** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.9.5. **Fachwissen** – siehe Allgemeine Empfehlungen.

2.9.6. Qualitätskontrolle

a. Ein Minimum an 3 Kontrollmaterialien sollte mit jedem Testdurchlauf mitgetestet werden. Diese beinhalten kommerzielle Kontrollen für hohe, normale und niedrige Werte oder betriebsintern erstellte Proben.

b. Die Interpretation von RIA-Ergebnissen hängt häufig von der Methodik und von laboreigenen Referenzwerten ab, was die Verwendung von einigen Arten an externen Kontrollsystemen erschwert. Es wird empfohlen, bei der Verwendung von externen Kontrollmaterialien zusätzlich laboreigene Materialien zu analysieren und die Interpretation zu vergleichen.

c. Externe Kontrollen sollten mindestens vierteljährlich durchgeführt und in Diagrammen festgehalten werden.

d. Über alle Kontrollmaterialien sollte Buch geführt werden, und Diagramme sowie Werte sollten dem Testpersonal leicht zugänglich sein. Levy-Jennings-Diagramme sind akzeptabel.

e. Ein Aktionsplan mit Details zur Akzeptanz oder Rückweisung von Patientenprobenergebnissen auf Basis von Kontrollwerten sollte vorhanden sein.

f. Falls das Testverfahren je nach Ausführungen des Herstellers oder veröffentlichen Publikationen verändert wird (z.B. nur 1 Röhrchen pro Patient), sollte eine entsprechende Dokumentation vorhanden sein, die demonstriert, dass Testpräzision und Genauigkeit noch akzeptabel sind und innerhalb der Vorgaben liegen.

2.9.7. **Verfahrens-Leitfaden** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.9.8. **Testvergleich** – siehe Allgemeine Empfehlungen

2.9.9. **Durchführung von Ausser-Haus-Tests** – siehe Allgemeine Empfehlungen

3. Wichtige postanalytische Faktoren für die veterinärmedizinische Labordiagnostik

3.1. **Datenüberprüfung**. Das Labor sollte ein Verfahren für eine geeignete, doppelte Laborassistenten-Überprüfung, sowie Prüfung durch Laborleiter und/oder Labordiagnostiker erstellen, das Proben und/oder Ergebnisse beinhaltet. Die Überprüfung kann spezifisch für problematische Tests, Proben-Parameter und/oder klinische Bedeutung von Testergebnissen ausgerichtet sein.

3.2. **Dateneingabe und Befundung**. Befunde sollten genau sein, unabhängig ob sie manuell oder elektronisch in der Datenbank erstellt wurden. Die Daten sollten in einem Standardformat eingegeben werden, das vom Labor vorgegeben wird. Falls eine klinisch bedeutsame Ungenauigkeit vorliegt, sollten die Ergebnisse deutlich den Fehler definieren oder die Ergebnisse sollten nicht berichtet werden.

3.3. **Befundstellung**. Die Laborbefunde sollten in einem gut leserlichen und einfach verständlichen Format verfasst werden, das je nach Notwendigkeit geeignete Hinweise oder Erklärungen enthält. Die Berichte sollten im Verhältnis zu präanalytischen und analytischen Komponenten zudem zügig erstellt werden. Das Labor sollte eine Kopie aller Befunde sowie jegliche begleitende Arbeitsblätter zurückbehalten. Jeder Assistent oder Labordiagnostiker, der mit dem Ablauf oder der Interpretation an jeglicher Stufe des Verfahrens involviert ist, sollte den Bericht mit Initialen und Datum versehen.

3.3.1. Durchführung von Ausser-Haus-Tests (Aussendungen):Die Kunden sollten über solche Tests informiert werden, die von anderen Labors durchgeführt werden.

3.3.2. Jede Art von möglicherweise ungenauen Ergebnissen sollten übersichtliche und klare Bemerkungen im Bericht an den Kliniker beinhalten, die deutlich darauf hinweisen, dass die Werte ungenau und irreführend sein können und sollten begründende Details aufführen.

3.4. **Befundübermittlung.** Die Befundübermittlung sollte zügig erfolgen, an den korrekten Kunden und in einer Art und Weise, die vom Kunden und vom Labor vereinbart wurde.

3.5. **Probenlagerung.** Die Proben sollten unter geeigneten Bedingungen für einen zuvor festgelegten Zeitraum gelagert werden. Dieser Zeitraum wird aufgrund von Probenstabilität, Laborrichtlinien und/oder Zertifikations-/Zulassungs-Bestimmungen

festgelegt. Gefärbte Mikroskopie-Ausstriche können beliebig lange gelagert werden, wohingegen Proben wie Urin, Blut oder Körperhöhlenergüsse eine begrenzte Lagerzeit mit sich bringen. Im Allgemeinen sollten Blutproben von Vögeln nicht länger als 12 Stunden gelagert werden (einschließlich Transportzeit), wobei Blutproben von Reptilien länger als 24 Stunden gelagert werden können. Vollblutproben können bei -20°C für DNA-Analysen und bei -70°C für RNA-Analysen gelagert werden. Proben in frostfreien Gefriertruhen können möglicherweise durch wiederholte Gefrier-Auftau-Zyklen abgebaut werden.

3.6. **Probenentsorgung.** Laboratorien sollten biologisch gefährliche und nicht gefährliche Materialien und Proben geeignet und sicher entsorgen. Dies sollte die zeitgerechte Entleerung aller Behältnisse und Abfallkontainer mit einschließen.

3.7. **Personalsicherheit** – siehe präanalytische Empfehlungen

3.8. **Laborumgebung**. Nach Ausführung eines Testerfahrens sollte der Laborplatz gesäubert und in Vorbereitung für folgende Untersuchungen dementsprechend organisiert werden. Die Ausrüstung sollte gut instandgehalten werden, damit sie zu jeder Zeit einsatzbereit ist. Siehe präanalytischer Abschnitt für zusätzliche Empfehlungen.

3.9. **Anforderungen an das Laborpersonal** – siehe präanalytischer Abschnitt

3.10. **Verschiedenes**. Sobald die Analysen im Labor ausgeführt wurden, sollte der Bestand an Reagenzien und Verbrauchsmaterialen überprüft werden, und verbrauchte Artikel sollten wieder bestellt werden. Ein gut gepflegtes Inventursystem und eine Liste mit anerkannten Lieferanten stellen sicher, dass qualitativ hochwertige Materialien zu jeder Zeit zur Verfügung stehen.

Literaturverzeichnis

Links

www.aacc.org	American Association for Clinical Chemistry; ebenso zu finden unter DACC (Division of Animal Clinical Chemistry)
www.aavld.org	American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians
www.acvim.org	American College of Veterinary Internal Medicine
www.acvp.org	American College of Veterinary Pathologists
www.asvcp.org	American College of Veterinary Clinical Pathology
www.avma.org	American Veterinary Medical Association
www.bloodgas.org	
www.clsi.org	Clinical and Laboratory Standards Institute; formerly known as NCCLS
www.esvcp.org	Europen College/Society of Veterinary Clinical Pathology
www.isacp.org	International Society for Animal Clinical Pathology
www.labtestsonline.org	
www.scireg.com	Science & Regulatory Consultants
www.sqa.org	Society of Quality Assurance
www.toxpath.org	Society of Toxicologic Pathology
www.westgard.com	Westgard QC

Regulierende Behörden

www.fda.gov	US Food and Drug Administration
www.cdc.gov/clia	Clinical Laboratory Improvement Ammendments
http://wwwn.cdc.gov/clia/regs/toc.aspx	Current CLIA Regulations (2004)
http://wwwn.cdc.gov/clia/pdf/42cfr493_2004.pdf	Part 493 Laboratory Requirements
http://www.gpoaccess.gov/cfr/index.html	Alternative site for Part 493 (CFR)

Publikationen

1. Good Laboratory Practice Regulations for Nonclinical Laboratory Studies Guidelines.
Title 21 Code of Federal Register, subchapter A, part 58. Federal Drug Administration(FDA), US Dept. of Health and Human Services (USHHS)
http://www.nal.usda.gov/awic/legislat/21cfr97.htm
2. Environmental Protection Agency, Good Laboratory Practice Standards: 40 CFR part 792(Toxic Substance Control Act)
http://law.justia.com/us/cfr/title40/40-31.0.1.1.3.html
3. Environmental Protection Agency, Expert in Laboratory Management; Quality Assurance/Control: 40 CFR part 160 (Federal Insecticide, Fungicide, and RodenticideAct)
http://www.intota.com/expert-consultant.asp?bioID=605165&perID=717458
4. Guidance for Industry, E6 Good Clinical Practice: Consolidated Guidance. USHHSFDA.
Covering recent topics such as Immunotoxicology Evaluation of Investigational
New Drugs, General Principles of Software Validation, Bioanalytical Method Validation,

and Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures --Scope and Application.
http://www.fda.gov/cder/guidance/959fnl.pdf idance/959fnl.pdf
5. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. US Dept. of Health and HumanServices, Public Health Service, National Institutes of Health, NIH Publication No. 8623, Revised 1996.
http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=5140
6. Office of Laboratory Animal Welfare website
http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm

Zitierte Publikationen

1. Adcock D, Kressin D, Marlar RA. 1998. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. Blood Coagul Fibrinolysis 9:463–470.
2. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA.1998. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence of citrate concentration. Am J Clin Pathol 09:595–599.
3. Albasan H, Lulich JP, Osborne CA, et al. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. J Amer Vet Med Assoc 2003;222:176-179.
4. Allen TA, Jones RL, Purvance J. Micribiologic evaluation of canine urine: direct microscopic examination and preservation of specimen quality for culture.
5. Arnold, J. Hematology of the Sandbar shark, Carcharhinus plumbeus: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. J Vet Clin Path; 2005; 34:115-123.
6. Arnold, J. White blood cell count discrepancies in Atlantic loggerhead sea turtles: Natt-Herrick vs. Eosinophil Unopette®. Proc Assoc Zoo Vet Tech Conf. 1994:15-26.
7. Arnold, J., Gargan, C, Belovarac, J. Method Validation Study for Total White Blood Cell Counts: Natt-Herrick versus Eosinophil Unopette ® Methods. Proc Assoc Zoo Vet Tech Conf. 2007: 49.
8. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between twomethods of clinical measurement. Lancet 1986; i:307-310.
9. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. 2002. Errors in laboratory medicine. Clin Chem 48:691–698.
10. Boral L, JB Henry. The Crossmatch. In: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Bernard and Henry, 18th ed. 1991.
11. Carter JM, Klausner JS, Osborne CA, Bates FY. Comparison of collection techniqüs for quantitative urine culture in dogs. J Amer Vet Med Assoc 1978;173(3):296-8.
12. Dale JC, Novis DA. 2002. Outpatient phlebotomy success and reasons for specimen rejection. Arch Pathol Lab Med 126:416–419.
13. Dein, FJ, Avian Leukocyte Counting Using the Hemacytometer, J Zoo Wild Anim Med; 1994; 25:3.
14. Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL. 2005 Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. Am J Clin Pathol 124:902–909.
15. Friedrichs KR, Young KM. Using an independent quality control software program, EZ

Runs, to monitor quality control procedures for a bench-top coagulation analyzer. Veterinary Clinical Pathology 2005; 34(3):218-223
16. George JW. Refractometers in veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. Vet Clin Pathol 2001;30:201-210.
17. Glick, M., Ryder, K., & Glick, S. Interferographs: User's Guide to Interferences in Clinical Chemistry Instruments. 1991. Indianapolis, IN: Science Enterprises, Inc.
18. Goulden BE. Assessment of the usefulness of the examination of a gram smear of fresh uncentrifuged urine in the determination of significant bacteriuria in dogs. N Z Vet J 1968;16(1-2):1-2.
19. Harr KE, Raskin R, Heard DJ. 2005. Temporal Hematologic and Biochemical Effects ofThree Commonly Used Anticoagulants on Macaw (Ara sp.) and Burmese Python (Python molurus bivittatus) Blood. Vet Clin Pathol. 34(4):383-388.
20. Hegstad-Davies, RL. 2006. A review of sample handling considerations for reproductive and thyroid hormone measurement in serum or plasma. Theriogenology. 66(3):592-598.
21. Hyloft-Peterson P, Stöckl D, Blaabjerg O, Petersen B, Birkemose E, Thenpont L, Flensted Lassen J, Kjeldsen J. Graphical itnerepretation of analytical data from comparison of a field method with a reference method by use of difference plots(opinion). Clinical Chemistry. 1997; 43:2039-2046.
22. Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. Veterinary Clinical Pathology 2006; 35(3):276-286.
23. Kratz A, Stanganelli N, Van Cott EM.2006. A comparison of glass and plastic blood collection tubes for routine and specialized coagulation assays: a comprehensive study. Arch Pathol Lab Med 130:39–44.
24. Lippi, G, Franchini, Montagnana, M, et al., 2006. Quality and reliability of routine coagulation testing: can we trust that sample? Blood Coagula Fibrinolysis 17:1-7.
25. Natt MP, Herrick, CA. New blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. Poult Sci. 1952; 31:735-738.
26. Osborne CA, Stevens JB. Urinalysis: A clinical guide to compassionate patient care. Shawnee Mission, KS: Bayer Corporation;1999:17-24, 51-62, and 125-131.
27. Padilla J, Osborne CA, Ward GE. Effects of storage time and temperature on quantitative culture of canine urine. J Amer Vet Med Assoc 1981;178(10):1077-81.
28. Rabinovitch A, Arzoumanian L, Curcio KM, Dougherty B, Halim A. Urinalysis – approved guideline, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute document GP16A3, 2009.
29. Raskin RE, Murray KA, Levy JK. Comparison of home monitoring methods for feline urine pH measurement. Vet Clin Path 2002;31:51-55.
30. Stöckl D, Dewitte K, Thienpont M. Validity of linear regression in method comparison studies: limited by the statistical model of the quality of the analytical data? Clinical Chemistry. 1998; 44(11):2340-2346
31. Sturgess, CP, Hesford A, Owen H and Privett R. An investigation into the effects of storage on the diagnosis of crystalluria in cats. J Fel Med Surg 2001;3:81-85.
32. Swenson CL, Boisvert AM, Kruger JM, gibbons-Burgener SN. Evaluation of modified Wright-staining of urine sediment as a method for accurate detection of bacteriuria indogs. J Amer Vet Med Assoc 2004;224(8):1282-9.

33. Tietz NW. A model for a comprehensive measurement system in clinical chemistry. Clinical Chemistry. 1979; 25(6):833-839.
34. Valenstein PN, Sirota RL. 2004. Identification errors in pathology and laboratory medicine. Clin Lab Med 24:979–996.
35. Westgard JO, Cary RN, Sold S. Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. Clinical Chemistry. 1974; 20(7):825-833.

Bücher/Buchkapitel

1) Belford, C. and Lumsden, J.H. Cytopathology. In: Manual of Small Animal ClinicalPathology. Davidson, M, Else, R.E. and Lumsden, J. (eds). British Small Animal V Veterinary Association, Cheltenham, 2998.
2) Bellamy JEC, Olexson DW. Quality Assurance Handbook for Veterinary Laboratories. Ames, IA. Iowa State University Press, 2000:101 pages total.
3) Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D, eds. Tietz Textbook of Clinical Chemistry, 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2005.
4) Campbell, TW. Avian Hematology. In: Avian Hematology and Cytology. Ames, IA: Iowa State University Press; 1988:6-13.
5) Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH and DeNicola D. Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat, 3rd ed. St. Louis, MO: Mosby, Inc.; 2007.
6) Day M, Mackin A, Littlewood J, eds. Manual of Canine and Feline Hämatology and Transfusion Medicine. Qüdgeley, Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association; 2000.
7) Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, ed. Schalm's Veterinary Hematology 5th ed. Malden, MA; Blackwell; 2000.
8) Freeman, K.P. Veterinary Cytology: Dog, Cat, Horse and Cow. Manson Publishing/TheVeterinary Press, London; 2008.
9) Fudge AM, ed. Laboratory Medicine: Avian and exotic pets. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2000.
10) Harvey JW. Atlas of Veterinary Hematology: Blood and bone marrow of domestic animals. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001.
11) Hawkey, C. M, Clinical Laboratory Medicine: The valü of clinical hematology in exotic birds, Exotic Animals, Jocobson, Kollias, Churchill Livingstone; 1988.
12) Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. Clinical Biochemistry of Domestic Animals 6th ed. San Diego, CA: Academic Press; 2008.
13) Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology 4th ed. Malden, MA; Wiley-Blackwell; 2003.
14) Linnet K, Boyd JC. Selection and analytical evaluation of methods—with statistical techniqüs. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds.) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2006:353407
15) Löb WF, Quimby FW, eds. The Clinical Chemistry of Laboratory Animals 2nd ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis; 1999.
16) Meyer DJ, Harvey JW. Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & diagnosis.

2nd. ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1998.
17) Osborne CA, Stevens JB. Urinalysis: A Clinical Guide to Compassionate Patient Care. Shawnee Mission, KS: Bayer Corporation, Agricultural Division, Animal Health; 1999.
18) Raskin RE, Meyer DJ. Atlas of Canine and Feline Cytology. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001.
19) Reagan WJ, DeNicola DB, Irizarry Rovira A. Veterinary Hematology: Atlas of common domestic species, 2Reagan WJ, DeNicola DB, Irizarry Rovira A. Veterinary Hematology: Atlas of common
domestic species, 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing: 2008.
20) Stockham SL, Scott MA. Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology, 2nd ed. Walden, MA: Wiley-Blackwell; 2008.
21) Thrall, MA et al. Veterinary Hematology and Clinical Chemistry. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
22) Westgard JO. Basic QC Practices Training in Statistical Quality Control for Healthcare Laboratories. 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2002.
23) Westgard, JO. Method validation: the experimental plan. In: Westgard. JO, ed. Basic Method Validation, Madison, WI: Westgard QC; 1999:48-55.
24) Westgard JO, Klee GC. Quality management. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds.) Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2006:485-529.
25) (a)Westgard JO, Quam E. Method validation: the linearity or reportable range experiment. In Westgard JO (ed.) Basic Method Validation, 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:102-112.
(b)Westgard JO. Method validation: the decision on method performance. In Westgard JO (ed.). Basic Method Validation. 3rd edition. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:188-196.
(c)Westgard JO. Method validation: the replication experiment. In Westgard JO (ed.) Basic Method Validation. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:114-122.
(d)Westgard JO. Method validation: the comparison of methods experiment. In Westgard JO (ed.). Basic Method Validation. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:124-136.
(e)Westgard JO. Method validation: statistical sense, sensitivity, and significance. In Westgard JO (ed.). Basic Method Validation. 3rd ed. Madison WI: Westgard QC, Inc.; 2008:138-152.
(f)Westgard JO. Method validation: the interference and recovery experiments. In Basic Method Validation. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:154-166.
(g)Westgard JO. Method validation: the detection limit experiment. In Westgard JO (ed.) Basic Method Validation. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:168-176.
26) Westgard JO. What are control materials and what characteristics are important? In Westgard JO (ed.) Basic QC Practices. 1st ed. Madison,WI: Westgard QC, Inc.;1998:33-46.
27) Wied, G. L., Bibbo, M. and Keeb ler, C.M. Diagnostic Quality Assurance in C Cytopathology. In: Comprehensive Cytopathology, 2nd ed. Bibbo, M. (ed). W.B. Saunders Co, London, 1997.

Fachzeitschriften – Allgemeine Referenzen, die häufig für die Qualitätssicherung relevante Information enthalten.

1) Clinical Chemistry, official publication of the American Association of Clinical Chemistry
2) Journal of Feline Medicine Surgery
3) Journal of the American Veterinary Medical Association
4) Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians
5) New Zealand Veterinary Journal
6) Toxicologic Pathology, official publication of the Society of Toxicologic Pathology
7) Veterinary Clinical Pathology, official publication of the American Society forVeterinary Clinical Pathology and the European Society for Veterinary ClinicalPathology
8) Veterinary Pathology, official publication of the American College of Veterinary Pathologists

Mitwirkende der ursprünglichen Richtlinien, sowie ehemalige und gegenwärtige Mitglieder der Qualitätssicherungs- und Standards-Kommission

Dr. Jim Bellamy
Pat Benson
Karen Curd
Dr. Jean Dodds
Dr. Ellen Evans
Dr. Susan Friend
Sü Gallagher
Karen Getzy
Julie Grünwaldt
Dr. James Klaassen
Dr. Sally Lester
Dr. Peter Lording
Dr. John Lumsden
Mike Mahoney
Dr. Larry McGill
Dr. Joanne Messick
Pam Miller
Dr. Scott Moroff
Dr. Fran Moore
Loretta Moore
Dr. Karen Russel
Dr. Carolyn Sink
Dr. Linda Vap
Dr. Gail Walter

Dr. Ellen Ziemer

Gegenwärtige und ehemalige Mitglieder, die zu den Überarbeitungen und Zusätzen der aktuellen Richtlinien beigetragen haben (2008)

Jill Arnold
Kirstin Barnhart
Julia Blanco
Rebecca Davies
Deborah Davis
Bente Flatland
Kathy Freeman
Kristen Friedrichs
Rebekah Gunn-Christie
Kendal Harr
Helen Kocmarek
David Korcal
Jim Matthews
Joanne Messick
Renee Pearson
Shannon Pedersen
Connie Peterson
Kristiina Ruotsala
Lynne Shanahan
Balazs Szladovits
Linda Vap
Connie Peterson
Kristiina Ruotsala
Lynne Shanahan
Balazs Szladovits
Linda Vap

Acknowledgement:
ASVCP thanks Nicole Stacy (Aquatic Animal Health, University of Florida, Gainesville, FL, USA), Ernst Leidinger (Invitro Laboratory, Vienna, Austria), and Stefanie Klenner (Justus-Liebig University, Giessen, Germany) for their translation.

Pautas de Control de Calidad de la ASVCP - Nuevamente ordenadas y revisadas

Principios de Garantía de la Calidad y Estándares para Patología Clínica Veterinaria.

Tabla de contenidos

1. Factores Pre-analíticos importantes en patología clínica veterinaria
   1.1 Generales, incluyendo hematología, endocrinología, química y serología
   1.2 Hematología manual en especies no-mamíferas
   1.3 Análisis de orina
   1.4 Citología/microbiología
   1.5 Pruebas de hemostasia (coagulación)
   1.6 Pruebas de compatibilidad sanguínea
   1.7 Radio inmuno análisis (no incluido)

2. Factores analíticos de importancia en patología clínica veterinaria
   2.1 General
      2.1.1. Monitoreo
      2.1.2. Validación de métodos
      2.1.3. Instrumentación
      2.1.4. Conocimiento del personal
      2.1.5. Control de calidad
      2.1.6. Manual de procedimientos
      2.1.7. Comparación de resultados de pruebas
   2.2 Química Clínica
   2.3 Hematología
   2.4 Hematología manual en especies no-mamíferas
   2.5 Examen de orina
   2.6 Citología
   2.7 Pruebas de hemostasia (coagulación)
   2.8 Pruebas de compatibilidad sanguínea
   2.9 Radio inmuno análisis

3. Factores post analíticos de importancia en patología clínica veterinaria

1. Factores Pre-analíticos de importancia en Patología Clínica Veterinaria

1.1. Generales, incluyendo Hematología, Endocrinología, Química y Serología

1.1.1. Recolección de Especimenes, Manejo y Transporte al Laboratorio. La informacion concerniente a los requisitos de muestras, recolección correcta, manejo y procedimientos de envío para cada ensayo realizado en el laboratorio debe estar al alcance del cliente ya sea de forma electrónica, escrita (como por ejemplo manual de servicios de laboratorio, papeletas de información especial, revistas o boletines) o por conversación telefónica personalizada. Las muestras deben ser recolectadas de acuerdo a las prácticas estándar. Los folletos provenientes de los fabricantes de instrumentos tienen descripciones detalladas de las muestras apropiadas, incluyendo tipo de tubos para recolección y condiciones de manejo. Las especificaciones para la entrega de muestras tiene que ser entregada al cliente por cada laboratorio. Las muestras deben ser manejadas cuidadosamente y transportadas al laboratorio de manera puntual y bajo condiciones apropiadas con la estabilidad requerida y el tipo de muestra. El tipo de muestra (por ejemplo sangre, suero, plasma, orina, etc.) debe ser claramente identificada en la etiqueta del espécimen. Cambios en los protocolos recomendados pueden afectar adversamente los resultados de la prueba. Contacte al fabricante para detalles específicos.

a. **Hematología**

i. Frotis de sangre hechos en la clínica no deben ser refrigerados sino protegidos de la condensación y el frio durante su transporte al laboratorio.

ii. Muestras con anticoagulante para hematología que a simple vista se encuentren con macro-coágulos produciran resultados con errores variables. La clínica debe ser contactada ya sea por escrito o por telefono e informada de que la muestra va a producir resultados erroneos. Debido a que la variación e inexactitud no pueden ser predichas, las muestras con coágulos son inadecuadas para su análisis y por lo tanto no se recomienda el uso de estas muestras. Si muestras de cuestionable o baja calidad son analizadas entonces cualquier procedimiento y posible deficiencia debe ser documentada por escrito por el laboratorio. Además cualquier resultado inexacto debe ser acompañado por comentarios, fácilmente vistos por el clínico, en el reporte de laboratorio, especificando claramente que esos valores pueden ser erróneos y engañosos.

1.1.2. Identificación de la Muestra. Las muestras deben ser identificadas con la información pertinente determinada por el laboratorio. La información debe incluir el nombre del dueño, especie, descripción del animal, nombre de la clínica

o doctor, dirección, teléfono, número de fax, dirección de e-mail, lugar anatómico de donde la muestra fue colectada, etc. Identificación única y correspondiente debe localizarse en ambas la solicitud de servicios del laboratorio y el recipiente de transporte.

1.1.3. Identificación de la Prueba. La prueba(s) ordenada(s) por el cliente deben ser claramente marcadas o solicitadas en la solicitud de servicios del laboratorio.

1.1.4. Registro de la Muestra. La información, identificación y las pruebas ordenadas por el cliente, deben ser correctamente introducidas al sistema de información del laboratorio (SIL). La información registrada en el SIL puede ser utilizada para rastrear la localización y el almacenamiento apropiado de la muestra por ejemplo, sección de inmunología vs. sección de hematología o congelar vs. refrigerar. El proceso de crear alícuotas y distribuir estas a la sección apropriada del laboratorio o a otros departamentos debe ser bien coordinado. Cualquier problema con la calidad de la muestra, incluyendo pero no limitado a hemólisis, lipemia, formación gelatinosa de la muestra u otro problema que pueda ser de significancia analítica debe ser documentado y reportado al cliente y al personal del laboratorio. Si el grado de inexactitud asociado con la calidad de la muestra es de importancia entonces la prueba en dicha muestra no debe llevarse a cabo y/o los resultados no deben ser reportados. Problemas con resultados reportados y no reportados deben ser comunicados al cliente y si es posible un nueva muestra debe ser obtenida.

1.1.5. Comunicación y Educación al Cliente . La comunicación entre el personal del laboratorio y el cliente (interno y externo) en relación con factores pre-analíticos que puedan influenciar los resultados de la prueba (ej. solicitud de servicios incompleta, muestra o manejo inapropiado o baja calidad de la muestra), debe ser oportuna y cortés. Los clientes deben ser informados del tiempo estimado para recibir los resultados preliminares y reportes finales. De igual manera la retroalimentación del cliente al laboratorio debe ser fomentada. Cualquier queja, retroalimentación o sugerencia ya sea verbal o por escrito debe ser enviada al nivel de gerencia apropiado. Para asegurar oportuno y apropiado seguimiento de acciones correctivas, las reuniones de gerencia o repaso por la organización deben ser documentadas.

1.1.6. Seguridad Del Personal. Deben proporcionarse condiciones adecuadas y de comodidad para el registro o la transcripción de datos en la computadora, el manejo de muestras, desecho de muestras y para otras tareas. Se debe dar atención especial al trabajo repetitivo. El equipo de protección personal (EPP) debe ser el apropiado para manejar las muestras y operar el equipo en todas las áreas del laboratorio clínico. Procedimientos de seguridad para el desecho de todas las muestras, basura y otros suministros deben ser apropiados para el tipo

de material. El personal debe recibir entrenamiento de seguridad y bioseguridad en relación a la exposición de químicos peligrosos o patógenos infecciosos presentes en materiales biológicos. La documentación de entrenamiento en ambiente, salud y seguridad debe estar disponible y lista para cada empleado. El entrenamiento debe incluir prevención de contaminación bacteriológica básica así como información de enfermedades zoonoticas. Todo entrenamiento debe ser documentado.

1.1.7. Ambiente del Laboratorio. El ambiente del laboratorio debe cubrir los estándares requeridos y necesarios para la seguridad, rapidez, eficiencia y desempeño efectivo. El espacio de trabajo debe estar bien iluminado y organizado de manera que se fomente la eficiencia y la seguridad. El equipo e instrumentos deben estar estar funcionando apropriadamente. Los protocolos de procedimientos deben estar actualizados y de fácil acceso para utilizarse como referencia en cuanto se necesiten. Las instalaciones del laboratorio y de operación deben cumplir con lo establecido por las agencias de gobierno apropiadas.

1.1.8. Requisitos del Personal. El personal debe cumplir con el entrenamiento indicado para las aéreas específicas del laboratorio. El entrenamiento, la educación continua y la re-certificación para las tareas especializadas deben planearse con regularidad y ser documentadas. El laboratorio debe contar con el personal adecuado para cumplir con la carga de trabajo.

1.1.9. Sistemas de Información de Laboratorio (SIL). Los SIL intentan mejorar el flujo de trabajo y la eficiencia del laboratorio. Previo a su implementacion, los SIL deben ser evaluados a fondo y se debe verificar que los sistemas pueden mantener expedientes precisos. SIL ineficientes y de manejo complicado deben ser actualizados y mejorados en base a las necesidades del laboratorio. SIL deben cumplir con todas las reglamentaciones legales gubernamentales para los archivos de expedientes médicos. Problemas con el registro de muestras o con el almacén de archivos almacenados deben ser corregidos inmediatamente.

1.1.10. Identificación de pruebas externas ("envíos afuera"): Los clientes deben ser informados de aquellas pruebas que son remitidas a otros laboratorios.

1.2. Hematología Manual en Especies No-Mamíferas.

1.2.1. Recolección, Manejo y Transporte de la Muestra al Laboratorio. El tiempo de transporte aceptable para sangre de aves es mas corto que el de mamíferos y reptiles. Estudios controlados han demostrado que la sangre refrigerada proveniente de aves se deteriora dentro de las primeras doce horas independiente

del tipo de anticoagulantes utilizado (Harr et al, 2005). El tiempo aceptable de transporte para frotis de sangre aviar es similar al de frotis de sangre de mamíferos y reptiles. Evidencia de agregación de leucocitos/trombocitos en el hematocitómetro debe ser reportada para indicar una cuenta total de Glóbulos Blancos (WBC) y Conteo Sanguíneo Completo (CSC) erróneos. Las muestras de hematología para especies de tiburones deben ser procesadas dentro de un lapso de 5 horas (Arnold, 2005). El EDTA (7.5% o 1-2 mg/ml de sangre) es aceptable para la mayoría de las especies, aunque no es apropiada para todas,. Muestras de sangre de rayas, algunos peces con esqueleto óseo y algunas especies de aves reacciónan de forma atípica en tubos comerciales con EDTA. La sangre proveniente de peces elasmobranchios (tiburón, rajideos y rayas) debe de ponerse en tubos con anticoagulante en polvo debido sus altos valores de osmolaridad en el plasma (~ 1000mmol/kg). Anticoagulantes líquidos pueden utilizarse si la osmolaridad esta ajustada debidamente..

1.2.2. Requisitos del Personal. El personal de laboratorio debe contar con el entrenamiento adecuado de manejo y preparación de muestras de especies exóticas de animales. El entrenamiento debe incluir prevención básica de contaminación por bacterias así como información de enfermedades zoonoticas incluyendo Chlamydophila, Virus del Oeste del Nilo, Salmonella, Influenza aviar y Giardia. La documentación de entrenamiento, educación continua y de evaluación periódica de habilidad deben ser hechos a la discreción del director del laboratorio.

1.3. Análisis de Orina

1.3.1. Recolección, Manejo y Transporte de la Muestra al Laboratorio. Identificación del método de recolección de orina es importante al momento de interpretar la presencia y concentración de posibles contaminantes incluyendo sangre y bacterias. La persona que suministre la muestra debe especificar claramente el método por el cual la orina fue obtenida, tales como libre flujo (antes de terminar, al principio, al final), cateterización, cistocentesis, del piso o de caja metabólica. Si la muestra es procesada dentro de los primeros 30 minutos entonces envases transparentes pueden ser utilizados para facilitar el examen a simple vista. Sin embargo, si el tiempo para hacer el examen de orina es mayor de 30 minutos entonces la muestra debe ser protegida de la exposición a rayos UV para prevenir la degradación de los componentes en la orina (ej. bilirrubina). Las tapas deben ser aseguradas para prevenir la evaporación y/o volatilización de sus constituyentes (ej. cetonas)

1.3.2. Almacenamiento de la Orina. Lo óptimo es que la orina se examine dentro de los 30 minutos después de su recolección. Si la examinación inmediata no es posible, entonces debe ser guardada a temperatura de refrigeración para

minimizar cambios físicos y químicos y para inhibir el crecimiento de bacterias. Recomendaciones estrictas del tiempo en que dura la muestra en refrigeración no pueden ser hechas debido a que depende de los componentes específicos de la orina. (Rabinovitch, 2009) Un almacenamiento no mayor a 24 horas en refrigeración es lo que se recomienda en general (Osborne sugiere con cautela un tiempo de 6-8 horas), pero la orina puede estar estable por periodos mas cortos o largos dependiendo de la composición inicial. Los componentes químicos que son particularmente inestables incluyen bilirrubina y glucosa además del pH si existe la presencia de bacterias. (Rabinovitch, 2009; Osborne, 1999) La estabilidad de los elementos formados de la orina dependen del pH y su concentración. Cristales pueden formarse *in vitro* durante el almacenamiento ya sea a temperatura ambiente o en refrigeración. (Albasan, 2003; Sturgess, 2001) Si la cristaluria es de interés clínico entonces orina recientemente obtenida debe ser analizada inmediatamente. Muestras refrigeradas deben alcanzar la temperatura ambiente previo a su análisis. Debido a que los resultados del examen de orina pueden afectarse por la duración de su almacenamiento y por la temperatura, la hora de recolección, la hora de llegada al laboratorio y el método de almacenamiento deben ser documentados. Métodos alternativos de preservación de muestras de orina están a disposición ya sea para mantener su estabilidad química, inhibir el crecimiento bacteriano y preservar sus elementos formados. Deben seguirse las instrucciones del fabricante con respecto al uso específico del preservativo en particular y a la duración del almacenamiento.

1.3.3. Cultivo Microbiológico. Para determinar la presencia significativa de bacteria en la orina se recomienda utilizar técnicas microbiológicas cuantitativas. Si se utilizan métodos de cultivo cuantitativos entonces, se prefiere que las muestras de orina sean recolectadas por cistosentésis, sin embargo las muestras por cateterización (muestra por sondaje) o micción espontánea son aceptables. Para evitar contaminación de la muestra primeramente la orina debe mandarse para su cultivo microbiológico y posteriormente para el examen general de orina. Alternativamente, se puede apartar una alícuota estéril de la muestra para que en caso de que sea necesario se realice un cultivo microbiológico. Muestras de orina refrigeradas por 6 a 24 horas son aceptables para cultivo microbiológico después del urinálisis. Muestras refrigeradas por 24 horas pueden resultar en cultivos falsos negativos. (Padilla, 1981) Si se ha utilizado un medio de transporte bacteriostático entonces no es necesario refrigerar la orina.

1.4. Citología /Microbiología

1.4.1. Recolección de la Muestra, Manejo y Transporte al Laboratorio. El cliente debe tener acceso a toda la información concerniente al envío de muestras para citología/microbiología ya sea en un manual de servicios del laboratorio, en una hoja de información, en una revista o artículo, en cualquier material escrito o por

instrucción verbal. Si se considera pertinente, las instrucciones deben dirigirse a temas como técnicas de recolección, recipientes apropiados (con o sin anticoagulantes), preparación de los frotes, fijación de la muestra. La recolección apropiada de muestras para citología/microbiología asegurará la posibilidad de una interpretación significativa.

1.4.2. Muestras citológicas no fijadas y secadas al aire así como los frotes sin teñir para citología deben protegerse de ser expuestos a formalina o vapores de formalina, lo cual interferiría con su posterior tinción. Debido a esto se deben transportar en recipientes fuertemente sellados o enviados separados de biopsias que hallan sido fijadas en formalina.

1.4.3. La identificación del sitio anatómico, método y hora de recolección de la muestra son de gran importancia ya que determinaran su optima preparación e interpretación. El citólogo veterinario o el citopatólogo deben tener conocimiento de los efectos que puedan tener en las muestras, especialmente muestras de fluidos, los diferentes métodos de recolección, la preparación retardada y el manejo inapropiado, en lo referente a las características citológicas esperadas y la interpretación de muestras. Uno o más frotes directos de las muestras de fluidos deben hacerse antes de realizar cualquier procedimiento de concentración o de fijación. Los frotes pueden teñirse o dejarse sin teñir y enviarse junto con la muestra de fluido. Esto permitirá la estimación del conteo célular y la proporción de varios tipos de células. Esta práctica puede proveer información invaluable que puede influenciar la interpretación citológica y provee un Control de Calidad (CC) adicional ya que permite que el citólogo/citopatólogo se asegure que el conteo célular corresponda razonablemente con las estimaciónes hechas en dicho(s) frotis(es). Esta práctica también evita que la densidad célular extrema de muestras concentradas evite la optima evaluación citológica.

1.5. Prueba de Hemostasia (Coagulación)

1.5.1. Recolección, Manejo y Transporte de la Muestra al Laboratorio. Para obtener resultados precisos en el examen de coagulación es preciso cumplir con los requisitos establecidos de recolección y almacenaje de muestras. El envase que debe utilizarse para obtener la muestra de sangre debe contener el anticoagulante citrato trisódico en una proporción de 9:1, y además la muestra debe mezclarse muy bien. Lo anterior se logra llenando el envase con sangre hasta la marca indicada. Las muestras que no cumplan con estas especificaciones deberán ser rechazadas. (Adcock, 1998) El volumen de citrato trisódico puede necesitar ser ajustado para muestras provenientes de animales con anemia marcada o policitemia. (Stockham and Scott, 2008, p. 277) Para análisis que requieran plasma, los envases con citrato trisódico deben centrifugarse y

refrigerarse a 2-8ºC. El plasma entonces debe separarse de los células sanguíneas y transferirse a un envase de plástico (no de vidrio). (Fiebig, 2005, Kratz, 2006) La estabilidad de la muestra a temperatura ambiente o en refrigeración (2-8ºC) es de 4 horas para Tiempo de Tromboplastina Parcial Activado; (TTPA), y 24 horas para Tiempo de Protrombina (PT). Si el análisis de la muestra no se realiza durante este intervalo de tiempo, entonces las muestras deben congelarse a -20 ºC. (Adcock, 1998) Para el análisis de función plaquetaria u otra prueba de coagulación la muestra de sangre mezclada con citrato trisódico debe idealmente guardarse por <1 hora. (Giger, por comunicación). Si en ves de que las muestras se envíen directamente al laboratorio son enviadas por correo, entonces el plasma debe contenerse en un tubo de plástico y congelarse para que posteriormente sea enviado en un paquete con hielo y arribar en no más de 24 horas.

1.5.2. Favor de revisar el boletín informativo de laboratorio número 1 1.5.1.A Un detalle adicional fue añadido en esta parte debido a que > 90% de resultados erróneos en la prueba de hemostasia deben ser atribuidos a factores pre-analíticos de transporte y manejo.(Lippi, 2006; Valenstein, 2009; Bonini, 2002; Dale, 2002)

1.6. Pruebas de compatibilidad sanguínea

1.6.1. Recolección de la Muestra, Manejo y Transporte al Laboratorio. Para la prueba de compatibilidad sanguínea se pueden utilizar suero o plasma, sin embargo la especie animal y el procedimiento a utilizar puede influenciar esta selección. Suero reciente puede servir como fuente del complemento para detectar hemólisis en perros y gatos, sin embargo este procedimiento no es comúnmente utilizado. Muestras para compatibilidad cruzada mayor incluyen suero del receptor (sin aditivo en el envase) ó plasma (EDTA o citrato trisódico) del receptor/paciente y muestra de sangre con anticoagulante (EDTA, ACD ó citrato trisódico) del donante ó concentrado de células rojas. Muestras para compatibilidad cruzada menor incluyen sangre con anticoagulante del receptor y suero ó plasma del donante(s). Las muestras del receptor/paciente y donante deben tener en lo posible menos de 24 horas. Las muestras del donante pueden ser tan viejas como la unidad de sangre que va a ser analizada para compatibilidad. Si las muestras no son utilizadas inmediatamente entonces deberán ser guardadas a 4ºC. Para ciertos procedimientos la sangre completa es utilizada mientras que en otros procedimientos se requiere un que la suspensión de glóbulos rojos sea lavada en solución salina tamponada con fosfato (PBS, por sus siglas en inglés). Deben seguirse las recomendaciones generales para la recolección, manejo y transporte de las muestras para análisis hematológico.

1.6.2. Identificación de la Muestra. Las muestras del paciente y donante(s) deben estar claramente etiquetadas con el dia y la hora en que se sometieron las muestras, y con la identificación del paciente y del donanate. Formas específicas para su envío deben ser consideradas para asegurar la precisa asignación de paciente y donantes.

1.7. Radioinmunoanálisis (esta sección se ha dejado intencionalmente en blanco por el momento)

Por favor véase Hegstad-Davies, 2006 para la revisión de literatura.

2. Factores Analíticos de importancia en patología clínica veterinaria

2.1. Generales

2.1.1. Monitoreo

a. **Monitoreo Interno.** Se recomienda el monitoreo interno de todo el equipo en relación a la seguridad de electrónicos, calibración así como mantenimiento y funcionamiento del equipo. Para cada aparato se recomienda un Registro de la Función de Aparatos que incluya información relacionada con la detección de cualquier problema, como se investigó y como se resolvió. En la sección 2.1.5 Control de calidad, se ha cubierto en detalle el uso de materiales de control de calidad con el propósito de monitorear el funcionamiento interno. Deben programarse regularmente revisiones sistemáticas de los resultados acumulados de control de calidad utilizando los gráficos de Levey-Jennings. Deberán tomarse acciones apropiadas cuando los resultados de control de calidad excedan los límites o demuestren una tendencia no deseada. (Westgard, 2006)

b. **Monitoreo Externo (Prueba de habilidad)**. El monitoreo externo debe incluir la participación en un programa de prueba de habilidad específico para laboratorios de diagnostico veterinario. Una descripción mas completa de la prueba de habilidad se puede encontrar en Bellamy y Olexson. (Bellamy, 2000)

   i. Todos los laboratorios participantes deben de analizar las mismas muestras.

   ii. Los resultados deben ser tabulados regularmente (mensual, cuatrimestral o anual) y distribuidos a los participantes junto con reportes estadisticos expresando la cercania del los resultados del laboratorio con la media del resto del grupo.

   iii. Las medias deben ser calculadas y analizadas basandose en la identificación del método (asegurarse de comparar los mismos métodos)

   iv. Cada laboratorio debe evaluar cuidadosamente la validez de su reporte de funcionamiento. Una marcada desviación de la media grupal debe investigarse rapidamente.

2.1.2. Validación de Métodos . Antes de adoptar una nueva prueba o introducir un nuevo equipo en línea, se debe de llevar a cabo la validación de métodos o equipo para asegurar que los procedimientos se realicen de acuerdo a los estándares de servicio del laboratorio y que funcionen de acuerdo a las declaraciones del fabricante. Los estudios de validación de métodos o equipo deben evaluar linealidad, precisión, exactitud, rango analítico, límite de detección inferior (LDI)/límite de detección biológico (LDB)/ sensibilidad funcional (SF) además de examinar los efectos de interferencia de las substancias utilizadas. Los intervalos de referencia y los procedimientos de control de calidad para el nuevo método se deben determinar antes de que se

inicien los pruebas en los pacientes. Si la información disponible para la creación de un intervalo de referencia es limitada o insuficiente, entonces esto se debe documentar en un apéndice a la prueba y se debe explicar en que se basa la interpretación.(Linnet, 2006)

Los requisitos de calidad analítica tales como el error máximo admisible (TE_a, por sus siglas en ingles) o la decisión de límites clínicos se deben establecer para cada prueba antes de iniciar los estudios de validación de métodos o del equipo. (Westgard, 1974). Estos requisitos sirven como método de referencia del funcionamiento de la prueba o test. El error total inherente del nuevo método o nuevo equipo, determinado durante los estudios de validación, debe estar dentro de los parámetros requeridos, si esto no ocurre entonces debe rechazarse. (Westgard, 2006b)

Los procedimientos de validación de métodos e instrumentos se deben poner en una lista y ser organizados en el orden en el cual se validaron. Existen numerosos programas de software en el mercado, los cuales facilitan el análisis estadístico de los resultados obtenidos de los estudios de métodos de validación. En la dirección electrónica www.westgard.com, usted puede encontrar información adicional y herramientas gráficas para realizar métodos de validación.

a. **Estudio de Linealidad:** Determina el rango reportable del método o prueba.

i. Cinco niveles de soluciónes son recomendados y se pueden preparar como indicado. Las soluciónes hechas con matrices que se aproximan a las muestras reales son preferidas a diluciones hechas con agua o solución salina. (Westgard, 2008a)

Nivel 1: cerca del límite de detección del ensayo
Nivel 2: 3 partes de la muestra conjunta de concentración baja más 1 parte de la muestra conjunta de concentración alta
Nivel 3: 2 partes de la muestra conjunta de concentración baja más 2 partes de la muestra conjunta de concentración alta
Nivel 4: 1 parte de la muestra conjunta de concentración baja más 3 partes de la muestra conjunta de concentración alta
Nivel 5: cuando se excede el límite alto esperado del ensayo

ii. Se recomienda que cada espécimen se analize de 3 a 4 veces (3 a 4 réplicas).(Westgard, 2008a)
iii. El valor de la media para cada espécimen se coloca en el eje “Y” y el valor esperado en el eje “X” (Westgard, 2008a)
iv. La gráfica se revisa para localizar puntos fuera de rango, linealidad así como la línea de ajuste óptimo. (Westgard, 2008a)

v. Si el ensayo resulta no linear dentro de lo que el fabricante recomienda como el intervalo de trabajo del ensayo entonces el método se debe rechazar. Alternativamente, el intervalo de trabajo se puede ajustar para colocarlo dentro de la parte linear.

b. **Estudio de replicación a corto plazo** (habilidad de repetición o dentro de cada corrida)**:** la estimación del error aleatorio (RE, por sus siglas en inglés) o imprecisión, del método durante un intervalo corto de tiempo. Las muestras son analizadas durante un solo turno laboral de 8 horas o dentro de una sola corrida analítica. (Westgard, 2008c)

i. Se pueden utilizar soluciónes estándar, materiales de control comerciales o muestras conjuntas recientes provenientes de pacientes.

ii. El nivel de los analitos debe aproximarse a los niveles de decisión clínica. Un mínimo de dos niveles (normal y alto) es recomendado cuando un incremento del analito es de importancia médica. Al menos tres niveles (bajo, normal, alto) se recomiendan cuando el incremento o disminución del analito es de importancia médica.

iii. Un mínimo de 20 réplicas se recomiendan durante el tiempo de intervalo de interés

iv. La distribución gaussiana se determina graficando (trazando) los datos en un histograma o gráfica normal. Si la distribución no es gaussiana entonces los datos se deben examinar para ver si hay valores atípicos ("outliers"). Las causas de los valores atípicos se deben determinar y corregir si es posible. Si la distribución gaussiana no se puede alcanzar después de haber eliminado los datos atípicos entonces la transformación de los datos puede ser necesaria para hacer análisis estadístico adicional.

v. El análisis de los datos incluye el cálculo de la media, la desviación estándar (SD, por sus siglas en inglés) y el coeficiente de variación (CV). .

vi. Compare la SD y el CV, como medidas del RE, con el estándar del laboratorio (TEa o decisión de límite clínico). Si SD o CV exceden este estándar, el método debe ser rechazado. Para esta valoración inicial, el sesgo (bias) se asume que es cero. Análisis adicionales incluyendo el sesgo (determinado en el estudio de comparación de métodos) deben llevarse a cabo después de que esta información este disponible.

c. **Estudio de replicación a largo plazo** (reproducibilidad o entre-corridas)**:** La estimación del error aleatorio (RE), o imprecisión, del método dentro de un periodo de tiempo largo que aproxima a las condiciones de trabajo reales. Un mínimo de 20 muestras es analizado durante diferentes turnos (y corridas) en un plazo mínimo de 20 días. La selección de las muestras y el análisis de los datos se realiza de la misma forma que el estudio de replicación a corto plazo

d. **Comparación de los Métodos:** La estimación del sesgo o el error sistemático (SE, por sus siglas en inglés), del (nuevo) método en comparación a un método de comparación, si este existe.

   i. Escoja el método de comparación o referencia considerando la precisión y calidad conocidas. El método de comparación puede ser un método definitivo, un método de referencia u otro método de campo conforme a la definición de Tietz. [Tietz 1979]. La comparación con datos generados durante pruebas de habilidad puede también ser considerada, sin embargo se debe prestar cuidadosa atención a la exactitud conocida de dichos datos.

   ii. Se recomienda un mínimo de 40 muestras de pacientes que deben ser examinados por ambos métodos (Jensen, 2006; Westgard, 2008d)

   iii. Las muestras deben representar la gama de resultados esperados durante la aplicación clínica del método, y así cubrir el rango de trabajo con un adecuado número de muestras en los términos del rango (Jensen, 2006)

   iv. Apesar de que es preferible hacer medidas en duplicado por cada método, una simple medida es aceptable.(Jensen, 2006) Los resultados deben examinarse al momento en que se llevan a cabo. Si utilizando los dos métodos se obtiene una diferencia significativa en los valores de una muestra, las pruebas se deben repetir inmediatamente para determinar si se repite dicha discrepancia o si es debido a un error.

   v. Las muestras analizadas por ambos métodos (nuevo y el de comparación) deben ser analizadas dentro de un periodo de no mas de dos horas de diferencia (o antes dependiendo de la estabilidad del analito). Se debe definir el manejo de la muestra para evitar variaciones extrañas entre los métodos. Si las muestras son analizadas en diferentes laboratorios (>2 horas intervalo entre las pruebas), la estabilidad de la muestra debe ser considerada.

   vi. El estudio debe conducirse dentro de un periodo de 5-20 días con preferencia al periodo de tiempo largo ej. 2-5 muestras por día por 20 días.

   vii. Análisis de datos:

      1. Se recomienda trazar los datos en una gráfica de comparación para llevar a cabo una inspección visual entre el método nuevo estudiado (eje "Y") y el método de comparación (eje "X"). Los datos atípicos deben re-analizarse si es que existen muestras frescas. Una línea de ajuste óptimo debe ser dibujada en base a la evaluación visual de los datos.(Jensen,2006)

      2. El cálculo de coeficiente de correlación ("r") se utiliza para determinar cual ecuación estadística debe utilizarse para estimar el error sistematico (SE) (sesgo), pero no es aceptable como medida de acuerdo. Para analitos que varían mucho, la regresión estadística se utiliza para determinar SE (sesgo). (Jensen, 2006; Westgard, 2008d) Para analitos que varían dentro de un rango estrecho (electrolitos) la

prueba de "t- test" se utiliza para determinar la SE (sesgo) (Westgard 2008d).

- Si $r \geq 0.99$ para los datos con un amplio rango o >0.975 para los datos con un rango estrecho, la estadística de regresión linear estándar puede ser utilizada para estimar la SE (sesgo) a concentraciones de decisión médica (Jensen, 2006; Westgard 2008d; Stockl, 1998). La SE (sesgo) a un nivel de decisión particular (Xc) puede determinarse calculando el valor de "y" (Yc) proveniente de la regresión linear

$$Yc = a(\text{pendiente})Xc + b(\text{intersección con el eje Y})$$
$$SE\ (\text{sesgo}) = Yc - Xc$$

- Si $r < 0.99$ (o <0.975), Los datos pueden mejorarse recolectando mas puntos de datos o disminuyendo la varianza por medio de medidas en réplica o estadísticamente haciendo un "paired t-test" para estimar la SE (sesgo) como la diferencia entre las medias de los resultados generados por los dos métodos. (Jensen, 2006; Westgard 2008d). Sin embargo el paired t-test no es aplicable cuando un error proporcional está presente (Westgard 2008e). Alternativamente los análisis de regresión Passing-Bablok o Deming pueden ser utilizados. La subdivisión de los resultados en grupos (bajo, dentro, o sobre el intervalo de referencia) puede ser utilizada para proporcionar evaluación adicional de las medias en rangos de importancia clínica. (Jensen, 2006)

viii. También se recomienda la creación de una gráfica o trazado de diferencia (Bland-Altman). La diferencia entre el método estudiado y el método de comparación es trazado en el eje "Y" y la media de ambos métodos es trazada en el eje "X". La línea de diferencia identifica la SE (bias). Para pruebas sin sesgo, los resultados son dispersados alrededor de la línea de cero diferencia , con aproximadamente ½ de los resultados por arriba y ½ de los resultados por debajo de dicha línea. (Bland, 1986; Jensen, 2006; Hyloft, 1997)

ix. El criterio para un funcionamiento aceptable depende del error total permitido (TE_a) para la prueba según determinado por cada laboratorio. El error total calculado (TE_{calc}) incluye la SE (sesgo) según determinada por la comparación de los métodos, y el RE (S) según determinado por el estudio de replicación a largo plazo. $TE_{calc} = Bias_{meas} + 3S_{meas}$. El funcionamiento es considerado aceptable si $TE_{calc} < TE_a$. Una Tabla de Decisión de Evaluación del Método que tome en cuenta los valores de

TE_a, SE y RE también puede ser utilizada para determinar la aceptación del método. (Westgard, 2008b)

e. **Estudio de interferencia :** Este estudio incluye la estimación del error sistemático causado por substancias dentro de la muestra a analizar. Estos errores son típicamente constantes con el tamaño del error en proporción a la concentración de la materia que esta interfiriendo con el método.(Westgard, 2008f). Entre las substancias o procesos que interfieren comúnmente están hemólisis, lipemia y bilirrubina (Bellany, 2000). Comparaciones adicionales pueden ser hechas entre plasma heparina vs. suero y muestras de suero recolectadas en tubos de gel vs. tubos sin nada así como otras substancias que interfieran según indicado por la prueba o instrumento de interés.

i. Soluciones estándar, muestras de pacientes o muestras conjuntas de pacientes pueden ser utilizadas. Las dos últimas opciones son preferidas debido a que son fácilmente disponibles y por su matriz compleja (Westgard, 2008f). Se deben elegir las muestras con varios niveles del analito que al menos incluya el rango clínico. (Westgard, 2006)

ii. Cantidades definidas de hemoglobina (provenientes de glóbulos rojos (RBC) lisados), lípidos (soluciónes comerciales disponibles) y bilirrubina (soluciónes estándar comerciales) serán añadidas a las muestras para alcanzar las concentraciones altas que se anticipan encontrar en muestras de pacientes (Westgard, 2008f).

iii. El volumen de interferente que se añadió debe minimizarse para evitar cambios en la matriz de la muestra (Westgard, 2008f). Se recomienda realizar medidas en duplicado con todas las muestras. Pequeñas diferencias en los valores del analito causadas por el interferente pueden ser disfrazadas por el error estándar inherente al método. Medidas en duplicado ayudan a prevenir este problema. (Westgard, 2008f)

iv. Las medidas deben realizarse por ambos métodos, el nuevo método y el método de comparación (si es que existe). Si ambos métodos muestran un SE (sesgo) similar causada por el interferente, la presencia de sesgo no es suficiente para rechazar el nuevo método. (Westgard, 2008f)

v. Cálculo del sesgo debido al interferente: (Westgard, 2008f)

1. Determine la media de las medidas en duplicado tanto de las muestras con interferente y de los controles.
2. Calcule la diferencia (sesgo) entre las muestras con interferente y sus controles. Repita esto para por todos los pares de muestras.

3. Calcule la media de la diferencia (sesgos) de todas las muestras con una concentración dada de interferente.

vi. Se recomienda utilizar el método " paired t-test" para comparar los resultados provenientes de las muestras con interferente, con los controles inalterados. Las regresiones estadísticas no son aplicables. Una estadistica "t-test" de 2, se utiliza para establecer los límites estándar. La estadística de t-test estima el número de desviaciones estándar en los que las muestras alteradas difieren de las muestras inalteradas (Westgard, 2008f)

vii. El criterio para un funcionamiento aceptable es $SE_{meas} < TE_a$. si el $SE_{meas} > TE_a$, el laboratorio debe decidir si las muestras que tienen una posibilidad de contener substancias de interferencia se pueden identificar antes de analizar o si las muestras deben ser rechazadas en caso de contener interferentes. Además, basado en estudios adicionales el laboratorio debe determinar si el interferente es cuantificable o semi-cuantificable.

f. **Estudio de recuperación:** Estimación del error sistemático (SE) proporcional. El SE proporcional ocurre cuando una substancia dentro de la matriz de la muestra reaccióna con el analito y compite por el reactivo. La magnitud del SE se incrementa a medida que la concentración del analito se incrementa. El SE proporcional se determina calculando el porcentaje de recuperación del analito estándar de analito que se añadió a la muestra del paciente (Westgard, 2008f).

i. Soluciónes estándares de alta concentración son frecuentemente utilizadas, ya que se pueden añadir en pequeñas cantidades con el objeto de reducir la dilución de la muestra y aun así lograr un cambio reconocible y significativo en la concentración del analito. La dilución de la muestra original no debe exceder del 10%.

ii. La cantidad de analito añadida debe de resultar en una muestra que alcance el siguiente nivel de decisión médica para ese analito en particular. Al igual que en el experimento de interferencia, las muestras a las que se les hallan añadido pequeñas cantidades se verán más afectadas por la imprecisión inherente del método en comparación a muestras a las que se le añadieron cantidades mayores.

iii. Se recomiendan hacer análisis en duplicado de las muestras con interferente y las muestras control. Las muestras deben analizarse por el método nuevo y el de comparación. El número de muestras de pacientes a analizar depende del número y tipo de reacciónes que se anticipe que produzcan un error sistemático.

iv. Cuando se lleva a cabo un estudio de recuperación como parte de la evaluación de un nuevo método, lo ideal es que se evalúen el nuevo método y el método de comparación si es que existe alguno.

v. Cálculo de datos (Para ver un ejemplo de como se lleva a cabo el cálculo de datos en un estudio de recuperación, vea Westgard, 2008f o http://www.westgard.com/lesson27.htm#4 Accesado en Noviembre 10, 2009)

1. Calcule la cantidad de analito añadido:

   Concentración estándar añadida x (ml stnd d/ml stnd añadido + ml muestra)

2. Calcule la media de las medidas en réplica de todas las muestras

3. Calcule la diferencia entre las muestras adulteradas y el control

4. Calcule la recuperación, dividiendo la diferencia entre la cantidad añadida

5. Calcule la media de la recuperación de todas las muestras examinadas en pares

6. Calcule el SE proporcional como [100% - recuperación %].

vi. El criterio para un funcionamiento aceptable es $SE_{meas} < TE_a$. Cantidades pequeñas de error sistemático proporcional pueden ser aceptables. Sin embargo, el método debe ser rechazado si se observa que el error sistemático proporcional es mayor que el error total permitido

g. **Intervalos de referencia para un nuevo método o equipo:** La creación de un nuevo intervalo de referencia o la validación de un intervalo de referencia existente son necesarios para realizar decisiones clínicas.

Véanse las nuevas guías de la ASVCP para la Creación y Mantenimiento de Intervalos de Referencia y Umbrales de Decisión.

h. **Estudio de los límites de detección:** Es la estimación de la concentración mínima del analito que se puede medir. Se recomienda la verificación del límite de detección en todas las pruebas en las que un valor bajo es de importancia clínica, por ejemplo, en pruebas forenses, concentraciones terapéuticas de medicamentos, HST, pruebas inmunológicas y marcadores de cáncer (Westgard, 2008g).

i. Se utilizan un muestra en “blanco” es decir que no contenga el analito de interés, y una muestra adulterada que contenga una concentración baja del analito. Varias muestras adulteradas conteniendo el analito al límite de detección declarado por el fabricante pueden ser necesarias..

ii. Se recomienda realizar 20 medidas en replicado por cada muestra.

iii. La medición de las muestras en “blanco” puede llevarse a cabo en un mismo día ya sea en cada “corrida” o entre “corridas”. Sin embargo, las muestras adulteradas deben analizarse durante un periodo de tiempo mas largo para así tomar en cuenta la variación de día a día o entre corridas. Comúnmente se utilizan un mínimo de 5 días (Westgard, 2008g)

iv. Las estimaciónes cuantitativas pueden reportarse de la siguiente manera:

1. El límite bajo de detección (LLD, por sus siglas en inglés)/ Límite de Cuantificación (LoQ, por sus siglas en inglés) es la media de la muestra en “blanco” + 2-3 x SD de la muestra en “blanco”.
2. El límite biológico de detección es la media de la muestra en “blanco” + 2-3 SD de la muestra adulterada.
3. La Sensibilidad Funcional es la media de la muestra adulterada que tiene un CV de 20%. Esto representa el límite mas bajo en el que la información cuantitativa es fiable. Para determinar una muestra adulterada con un CV de 20% se deben estudiar varias muestras adulteradas.

i. Selección de las reglas de CC para el monitoreo estadístico del funcionamiento del método (Validación del CC)

i. La validación del CC puede llevarse a cabo manualmente utilizando tablas de especificaciones de procesos operacionales (OpSpecs), la calculadora EZRUNS (www.westgard.com) u otro programa de control de calidad. (Friedrichs, 2005)

ii. Para determinar la posibles reglas de control que pueden ser aplicadas para la estadística del CC, la validación del CC utiliza TE_a (o el intervalo de decisión clínica) para la prueba, junto con el CV (RE) y el sesgo (SE), determinados en los experimentos de replicación y comparación de los métodos.(Westgard, 2006)

iii. Para la mayoría de los métodos automatizados , la probabilidad de detección de errores de un 90% y la probabilidad de rechazo falso de <5% son suficientes. Para ensayos que son extremadamente estables con pocos problemas anticipados, una probabilidad de detección del error tan baja como 50% puede ser aceptable. (QP15 Frequently Asked Questions About Quality Planning. Disponible en:www.westgard.com. Accesado en Noviembre 10, 2009.)

iv. Diferentes reglas de CC pueden ser requeridas para diferentes niveles de un analito (multinivel de CC). Por ejemplo, multi-reglas más estrictas de

CC pueden ser necesarias para detectar el error a bajos niveles de analito que a niveles altos del mismo.

v. La adopción de un nuevo método de calibración/mantenimiento del método puede requerir diferentes (mas estrictas) reglas de CC que aquellos que se aplican durante el uso rutinario del método. Esto se le conoce como CC multi-estado.

2.1.3. Instrumentación

a. **Funcionamiento del equipo:** El equipo o instrumentos y los métodos utilizados deben ser capaces de dar resultados que se encuentren dentro de las características de funcionamiento establecidas por el laboratorio. (Linnet, 2006). Esto incluye:

i. Rango analítico, incluyendo límites de detección y linearidad
ii. Precisión
iii. Exactitud
iv. Especificidad analítica - Medición del compuesto de interés. Esto debe dar un estimado y definir claramente cualquier substancia de interferencia. Debido a que las interferencias no pueden siempre ser evitadas, se debe considerar desarrollar gráficas de interferencia que examinen los efectos en los resultados de las pruebas al añadir lípidos, bilirrubina y hemoglobina. Las interferencias son especificas de especie por lo que es preferencia el crear gráficas o trazados de interferencia para cada analito y especie analizados.
v. Sensitividad Analítica
vi. Puntos adicionales a considerar:
1. Los instrumentos con configuraciones ajustables para diferentes substancias y/o especies deben ser cuidadosamente inspeccionados para conformidad.
2. Las características de funcionamiento definidas por el laboratorio y el fabricante deben compararse y hacerse ajustes cuando sea necesario.
3. Asegurese que ciertas diferencias entre especies sean consideradas. Generalmente los representantes técnicos del fabricante asisten en esta parte de la cualificación y configuración del equipo.

b. Inspección de las Funciones

i. La inspección apropiada de las funciones de las características operacionales críticas debe de realizarse en todos los instrumentos o equipos (p. ej. Desviación de la fuente de luz, poner en ceros, niveles eléctricos, alineación óptica, inspección del fondo, etc)

ii. Antes de analizar una muestra el personal del laboratorio debe llevar a cabo un CC y/o calibrar cada equipo diariamente o en cada turno laboral. El equipo debe ser operado de acuerdo las instrucciones del fabricante.

c. Calibración

i. El equipo debe ser calibrado al menos cada 6 meses. Calibraciones mas frecuentes pueden llevarse a cabo cuando: (Westgard, 2008a)

1. Es recomendado por el fabricante
2. Después de un servicio mayor
3. Cuando los valores de CC caen fuera de los límites o cuando sea indicado por los procedimentos de resolución de problemas.
4. Cuando la carga de trabajo, el funcionamiento del equipo o la estabilidad de los reactivos indiquen la necesidad de una calibración mas frecuente.

ii. Después de calibrar, los controles deben correr de acuerdo a los procedimientos normalizados de operaciones (SOP, por sus siglas en inglés)

2.1.4. Conocimiento del Personal. El personal del laboratorio debe tener buen conocimiento del equipo y su uso incluyendo, pero no limitado a los siguientes temas.

a. Diferencias de linearidad en animales en comparación con humanos
b. Los efectos que tienen en cada prueba la hemólisis, lipemia, ictericia, pigmentos carotenos, (en especial en grandes especies) y los diferentes anticoagulantes.
c. Rangos reportables
d. Rangos reportables e intervalos de referencia específicos para especies o para cepas.
e. Rangos fisiológicos esperados. Se puede establecer un criterio de repetición para re-analizar las muestras. El criterio para repetir una prueba, debe incluir a cualquier equipo o instrumento que genere mensajes o banderas de error, así como resultados que se ubiquen extremadamente fuera del rango fisiológico normal. Para este último, se deben considerar el uso de "valores de pánico" pre-programados en el sistema operativo del analizador bioquímico. Se debe comunicar al cliente como parte del reporte, que la muestra se re-analizo para confirmar el resultado anormal.

f. Problemas comunes encontrados en las muestras veterinarias así como los pasos apropiados a tomar cuando se presenten los diferentes mensajes o banderas de error.
g. Programa regular del mantenimiento del equipo (diario, semanal, mensual y cuando sea necesario)
h. Reemplazo de equipo inadecuado o defectuoso
i. Procedimientos de resolución de problemas (troubleshooting)

j. Uso apropiado de comentarios y criterio específicos para especies. Los comentarios y el criterio específico para especies pueden ser de beneficio interpretativo para los clientes. La comunicación directa con los clientes debe limitarse a aquellos en la organización que estén calificados para proveer la interpretación de datos de acuerdo a la historia clínica y a las terapias previas.

2.1.5. Control de Calidad . Los calibradores y controles deben ser identificados apropiadamente, su uso y frecuencia de uso deben ser documentados como parte del plan de calidad para asegurar exactitud de los resultados. (Westgard, 1998). La documentación y generación de acciones apropiadas deben seguir reglas y políticas establecidas para el análisis de los parámetros de CC. Esto puede incluir, la confirmación de resultados y el apropiado uso de tablas, gráficas y entrada de datos según determinados por el laboratorio para cada departamento y/o tipo de equipo. Debe de haber una estructura o sistema de reportaje que informe a la administración del laboratorio sobre problemas con el CC, además los problemas que requieran de atención deben ser remitidos al lugar correcto dentro de la organización. Controles sobre acciones correctivas deben estar en su lugar para así evaluar la efectividad de estas acciones.

a. Selección de reglas de CC para el monitoreo estadístico del funcionamiento de métodos (Validación de CC)

i. La validación del CC puede llevarse a cabo manualmente utilizando tablas normalizadas OpSpecs, calculadora EZRUNS (www.westgard.com) u otro programa de garantía de la calidad.

ii. Para determinar las reglas posibles de control que se pueden aplicar a la estadística de CC, la validación del CC utiliza Te_a como requisito (intervalo de decisión clínica) para la prueba de Coeficiente de Variación (RE-error estándar) y sesgo (SE) provenientes de los experimentos de replicación y comparación de los métodos.

iii. Para métodos más automatizados, una probabilidad de detección de errores de un del 90% y una probabilidad de rechazo falso de <5% son suficientes. Para ensayos extremadamente estables con pocos problemas anticipados, una probabilidad de detección del error tan baja como 50% puede ser acceptable.

iv. Diferentes reglas de CC pueden ser requeridas para diferentes niveles de un mismo analito (CC de multinivel). Por ejemplo, multiples y más estrictas reglas de CC pueden requerirse para detectar errores a bajos niveles de concentración del analito que cuando este se encuentra en altos niveles de concentración.

v. Diferentes reglas de CC pueden preferirse, durante la adopción de un nuevo método o después calibrar y mantener un instrumento, comparado a aquellas reglas requeridas durante el uso rutinario de un método establecido (CC de multiestado). Las reglas de CC utilizadas en la situación anterior son típicamente más estrictas que las reglas utilizadas en al situación posterior.

b. **Los Reactivos y materiales** utilizados para los procedimientos deben etiquetarse con la fecha de llegada y fecha en que fueron abiertos y deben ser guardados de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, cuando esto aplique. Debe observarse la fecha de caducidad o expiración. Reactivos expirados deben ser desechados adecuadamente. Por lo general las concentraciones de los analitos en materia de control, representan niveles bajos y altos con respecto a anormalidades patológicas humanas y también representan concentraciones normales en humanos. Si las concentraciones patológicas en especies animales son significantemente divergentes de estos niveles en humanos, puede ser necesario incluir materiales de control adicionales con niveles del analito similar a las concentraciones o actividad patológicas en animales.

c. La selección de número de controles depende**,** en parte del funcionamiento del equipo y es parte del proceso de validación de CC. Comúnmente se utilizan de 2-3 materiales de control, pero con algunas pruebas se pueden necesitar puntos de datos CC adicionales para asegurar una probabilidad mayor de detección del error y una baja probabilidad de rechazos falsos.

d. **Una corrida no debe durar más de** 24 horas a menos que el fabricante recomiende corridas de control mas frecuentes.

e. **La verificación de la estabilidad del reactivo** durante la "duración de la corrida" debe hacerse durante la validación de métodos. Los materiales/reactivos de control se deben evaluar múltiples veces a través, de una completa "duración de la corrida" y comparando el resultado de la media y la (desviación estándar) SD con los resultados provenientes de experimentos de precisión "de entre-corridas".

f. Establecimiento de la frecuencia de CC siguiendo las consideraciones siguientes

i. Frecuencia de la prueba y producción (número de pruebas realizadas durante cada corrida o cada día)
ii. Grado al cual los requisitos del método y calidad para cada prueba dependen de un funcionamiento técnico de precisión.
iii. Estabilidad del analito o reactivo
iv. Frecuencia de fallas del CC

v. Entrenamiento y experiencia del personal
vi. Costo del CC (incrementar la frecuencia añade costo por prueba)

g. Parámetros de Control de Calidad:

i. Los laboratorios deben establecer un criterio o verificar los criterios del fabricante en cuanto a lo que es un rango aceptable de funcionamiento para materiales de CC. La Media, SD y el CV deben ser calculados con un mínimo de 20 mediciones. Es recomendable que los materiales de control de calidad provengan del mismo número de lote.
ii. Los controles deben evaluarse de la misma forma en que se procesan las muestras de pacientes.
iii. Al menos 1 nivel de material de control debe analizarse después de que se cambia de lote de reactivo
iv. Se debe establecer un mecanismo para determinar si el personal de pruebas sigue las políticas y procedimientos correctamente.
v. Se recomienda el uso de procedimientos de multireglas Westgard u otras reglas basadas en la validación de CC.
vi. Los resultados acumulados de control de calidad deben ser revisados sistemáticamente de manera regular. Por ejemplo, a través del uso de diagramas de Levey-Jennings y acciones tomadas apropiadamente cuando los resultados de control de calidad exceden los límites o demuestran tendencias no deseadas.
vii. Las políticas y procedimientos deben estar contenidos en un manual de procedimientos. El personal debe documentar las revisiones anuales (o mas frecuentes) de políticas y procedimientos.
viii. Los registros de CC deben revisarse frecuentemente para asegurar que se tomen acciones adecuadas cuando los resultados de CC fallen en cumplir los criterios de aceptabilidad. Acciones correctivas deben ser explicadas al personal de laboratorio.
ix. Los controles, preferentemente provenientes del mismo número de lote, deben ser adquiridos comercialmente. Use diferentes lotes para cada función si se utilizan calibradores como controles. Si se utilizan conjuntos de muestras de pacientes, se deben establecer el valor de la media de todos los analitos (mínimo n=10 para establecer la media)
x. Monitoreo de los resultados de las muestras clínicas para varias fuentes de error utilizando parámetros como “anion gap” (diferencia de los aniones plasmáticos), comparación de los resultados de las pruebas con pruebas del mismo paciente analizadas previamente (verificación delta), e investigación de resultados marcadamente anormales (verificación de límites)
xi. Se deben seguir las instrucciones del fabricante para el mantenimiento de rutina (diario, seminal, mensual) y calibración, a menos que los laboratorios hayan hecho modificaciones con instrucciones apropiadamente documentadas para su propio uso. Un registro de

mantenimiento de instrumentos, calibración y reparación debe mantenerse en el laboratorio o por una unidad de metrología.

2.1.6. Manual de Procedimientos. Véase Westgard and Klee para una orientación de procedimientos recomendados en el manual de contenidos. (Westgard, 2006). Los protocolos pueden ser organizados como copias impresas en manuales y/o guardados en la computadora. Todos los procedimientos que estén en uso actual deben estar incluidos en el Manual de Procedimientos el cual es accesible para todo el personal que lleva a cabo las pruebas. Las ediciones deben ser realizadas por un individuo o individuos identificado(s). La organización del manual(es) variara con el tamaño, las necesidades y requisitos de la instalación. Algunas organizaciones acreditadoras pueden tener requisitos específicos y Procedimientos Normalizados de Operación (SOPs) específicos son recomendados. La mayoría de los procedimientos de laboratorio deben ser adecuadamente cubiertos por las categorías listadas aquí. Tras la finalización del entrenamiento de nuevo personal, se debe implementar una lista de verificación para documentar su habilidad llevando a cabo una prueba y su conocimiento de los aspectos relativos a la prueba. Cuando sea tiempo de revisar la documentación de los procedimientos, una revisión con el personal pertinente es recomendada para asegurar que existe familiaridad con los procedimientos revisados.

a. Indice

b. Información General

i. Políticas y Procedimientos Generales
ii. Información de la Garantía de la Calidad
iii. Duración del Almacenamiento de las muestras y su desecho
iv. Almacenamiento de Datos sin Procesar y su Desecho
v. Envíos de Rutina
1. Información del Laboratorio que Provee el Servicio de Pruebas
2. Requisitos para las Muestras
3. Guías de Envió
4. Tiempo de Respuesta (Turn-around time)

c. **Procedimientos Normalizados de Operación (SOPs) para cada procedimiento** La cantidad de información contenida en un SOP puede variar, pero los siguientes tópicos son recomendados. (Westgard, 2006)

i. Título (incluyendo la fecha o número de la versión)
ii. Propósito y aplicación del procedimiento
iii. Principios de la Prueba
iv. Gestión de las muestras
1. Preparación del paciente (p. ej. Information específica de especie)
2. Recolección, proceso y manejo de la muestra (p. ej. Volumen mínimo)
3. Criterio para el rechazo de muestras

v. Precauciones y limitaciones operacionales
   1. Riesgos/Peligros
   2. Interferencias con el método en uso
      - . Hemolisis, ictericia, lipemia
      - Anticoagulantes
      - Medicamentos, etc
   3. Rango reportable
   4. Si es aplicable sensitividad y especificidad
vi. Reactivos
   1. Condiciones y lugar de almacenamiento
   2. Preparación
   3. Vida de anaquel
   4. Fabricante (p.ej. contenidos)
vii. Equipo y suministros
   1. Equipo o herramientas necesarias para completar el procedimiento
   2. Ubicación de los suministros
   3. Acciones a tomar cuando el sistema deje de funcionar (referirse a la sección de envío o proveer información adicional)
viii. Procedimientos de calibración y control de calidad
   1. Materiales
   2. Frecuencia
   3. Interpretación (cuando verificar, rehacer, solución de problemas, etc.)
ix. Procedimientos (instrucciones paso a paso)
x. Intervalos de referencia apropiados para cada especie
xi. Interpretación y reporte: valores críticos (acciones recomendadas)
   1. Cadenas de comunicación
      - Personal interno
      - Información del representante técnico
   2. Pasos para solución de problemas
      - Hacer una evaluación de CC
      - Repetición de la prueba
      - Diluciones (diluyentes apropiados)
xii. Referencia de literatura
xiii. Documentación
   1. Nombre, fecha y firma del realizador (fecha de implementación si es diferente a la de realización)
   2. Nombre, fecha y firma del revisor (si es applicable)
   3. Registro de entrenamiento
xiv. Appendices
   1. Registros o hojas de trabajo
      - Registro de observación y solución de problemas
      - Registro de resultados

2. Folletos insertados en los paquetes (Mucha de la informacion anterior puede obtenerse directamente de los folletos insertados en los paquetes. En ese caso, los SOP pueden referirse a secciones aplicables de dichos folletos).
3. "Hojas de acceso rapido" (Cheat sheets)
   - Pautas de referencia rapida
   - Título y versión del procedimiento

2.1.7. Comparación de los Resultados de la Prueba. Si el laboratorio lleva a cabo una misma prueba utilizando mas de un método en más de un sitio, o si es remitida a otro laboratorio entonces, se deben correr comparaciones al menos anualmente para definir la relación entre métodos y sitios. Actualmente las Guías para Comparación de Métodos están bajo desarrollo. Por favor revise la página Web de la ASVCP. Los siguientes pasos deben de ser incluidos:

a. Comparación de un mínimo de 20 muestras que cubran el rango analítico.
   i. Graficar o trazar datos en una gráfica de comparación de ejes de X-Y
   ii. Calcule la pendiente e intersección utilizando el método de mínimos cuadrados.
   iii. El uso de un programa ("software") de computadora estadístico para patología clínica, tal como EP Evaluator que permite la comparación de métodos utilizando un juego de rangos analíticos y objetivos de funcionamiento proveídos por CLIA.

b. El director del laboratorio o personal calificado deben definir los límites de funcionamiento aceptables.

c. Si los resultados individuales de una prueba en un mismo paciente o espécimen no establecen una correlación entre ellos (p. ej. nitrógeno ureico/ creatinina, balance electrolítico), entonces se debe investigar la causa, documentar la situación, e implementar acciones correctivas.

d. Verificación de enzimas, deben ser comparadas entre analizadores al menos cada 6 meses (bianual) y cada vez que se lleve a cabo cualquier servicio técnico significativo o algún otro problema. La verificación de enzimas se completa llevando a cabo un estudio de linealidad y comparando los resultados entre analizadores a través de una regresión linear.

2.2. Química Clínica

2.2.1. Monitoreo

a. El monitoreo interno debe incluir lo siguiente.
   i. Calidad del agua (según especificado para el equipo y ensayos o pruebas)
   ii. Estabilidad de la corriente eléctrica (según especificado para el equipo o instrumentos)

iii. Temperatura del baño María, refrigerador y congelador (se recomienda diariamente). Equipos grandes pueden ser cableados a un sistema de alarma para alertar a los usuarios cuando las temperaturas se encuentren fuera de los rangos especificados.

iv. Calibración periódica de las balanzas y pipetas analíticas (se recomienda anualmente)

v. Se deben mantener al dia y tener disponibles formularios o manuales de SOP con fechas de implementación inicial y la versión claramente indicada. El sistema debe ser de tal forma que únicamente copias actualizadas sean utilizadas y las versiones obsoletas sean archivadas pero no al alcance para su uso y circulación inadvertidos.

vi. Almacenamiento, manejo y mantenimiento apropiados del inventario.

vii. Mantenimiento de un registro que contenga cambios en los procedimientos, problemas con los métodos o instrumentos y acciones tomadas para resolver problemas. Todos los datos deben ser claramente fechados y firmados por el personal de laboratorio. Esta función puede ser realizada por por una unidad de metrología y mantenerse electrónicamente para tener un fácil acceso durante inspecciones regulatorias o de garantía de la calidad.

b. Monitoreo externo – vea las Recomendaciones Generales

i. Validación de métodos – vea las Recomendaciones Generales

ii. Instrumentación – vea las Recomendaciones Generales

iii. Conocimiento del personal – vea las Recomendaciones Generales

iv. Control de Calidad – vea las Recomendaciones Generales

V. Manual de Procedimientos – vea las Recomendaciones Generales

vi. Comparación de las pruebas – vea las Recomendaciones Generales

vii. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones Generales

2.3. Hematología

2.3.1. Monitoreo – vea las Recomendaciones Generales

2.3.2. Validación de Métodos – vea las Recomendaciones Generales. No todos los experimentos para validar los métodos listados en la sección 2.1.2 pueden ser aplicados a la evaluación de los analizadores hematológicos automáticos. Los experimentos de validación de métodos deben ser seleccionados o modificados como sea necesario para asegurar que los nuevos métodos/analizadores estén funcionando satisfactoriamente y así, cumplan con los requisitos del laboratorio y las especificaciones del fabricante.

2.3.3. Instrumentación – vea las Recomendaciones Generales

2.3.4. Conocimiento del personal – vea las Recomendaciones Generales

2.3.5. Control de calidad para Hematología – vea las Recomendaciones Generales

a. Pruebas automatizadas, cálculo de índices y microscopia

i. Conteo de eritrocitos (RBC, por sus siglas en inglés)

ii. Concentración de Hemoglobina
iii. Hematocrito
iv. Morfología de RBC incluyendo RDW, HDW, MCV, MCH/*CH y MCHC/*CHCM (por sus siglas en inglés)
*(*Medición laser directa utilizando el analizador hematológico Advia)*
v. Conteo total de leucocitos (WBC, por sus siglas en inglés)
vi. Conteo diferencial de leucocitos (microscopia o automatizado)
vi. Morfología de RBC y WBC (microscopia)
viii. Conteo de plaquetas
ix. Índices plaquetarios incluyendo (volumen plaquetario medio) MPV (por sus siglas en inglés) y PCT (por sus siglas en inglés)
x. Cuenta de reticulocitos (microscopia y automatizada)
xi. Los frotis sanguíneos deben prepararse, teñirse y guardarse para su examinación microscópica a discreción del patólogo clínico

b. Recomendaciones

i. Los diferenciales automáticos deben ser verificados manualmente (microscopia) evaluando el frotis sanguíneo. Se debe establecer un criterio para situaciones que requieran la examinación microscópica del frotis sanguíneo para verificar los conteos automáticos (p. ej. conteo >20,000/µL en el total de WBC).
ii. Conteo manual de células: Los conteos manuales de células utilizando un hematocitómetro deben realizarse en duplicado. Si hay una diferencia de >10% entre los conteos obtenidos, entonces se necesitan recargar las cámaras y hacer el conteo de nuevo y en duplicado. Si un control es utilizado para hacer conteo de WBC, RBC y plaquetas entonces se utilizan ya sea un nivel de material ya probado o un control de procedimiento (definido abajo) este método debe ser analizado cada vez que se utilice o por cada turno laboral.
    i. Un control de procedimiento se define de la siguiente manera:
        a. Diluciones en duplicado de cada control ensayado o, de un paciente previamente-ensayado. Los resultados pueden ser comparados con límites previamente definidos para diferencias entre duplicados. (Este es el único proceso de control aceptable para conteos manuales de RBC).
        b. Los conteos de WBC y plaquetas pueden ser comparados con un valor estimado proveniente del frotis de sangre periférica.
iii. Frotis de sangre teñidas con azul de metileno pueden ser evaluadas microscópicamente para el conteo de reticulocitos. Si el conteo se realiza en duplicado (dos frotis), los resultados no deben diferir en >10%.
iv. Conteos automatizados de reticulocitos deben correlacionar con la proporción de eritrocitos policromatófilos observados en un frotis sanguíneo teñido.

v. Hematocritos por centrifugación (PCV, por sus siglas en inglés) deben aproximar el hematocrito (Hct) calculado por un analizador automatizado utilizando MCV y el número de RBC. El laboratorio debe fijar la diferencia máxima aceptable, la cual puede variar entre especies.

vi. La concentración de hemoglobina corpuscular media (MCHC) puede exceder el intervalo alto de referencia cuando la muestra esta hemolizada (*in vivo* o *in vitro*), lipémica y en presencia de cuerpos de Heinz. En ausencia de estas condiciones, un alto MCHC puede indicar un error del equipo.

2.3.6. Manual de procedimientos – vea las Recomendaciones generales
2.3.7. Comparación de las pruebas – vea las Recomendaciones generales
2.3.8. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones generales

2.4. Hematología Manual en Especies No-Mamíferas

2.4.1. Monitoreo. El monitoreo interno debe incluir lo siguiente: monitoreo de la preparación de reactivos diluyentes para el conteo célular (agua grado reactivo, verificación de la calidad de un nuevo lote en comparación con el previo)

2.4.2. Validación de métodos – véanse también las Recomendaciones generales. El analista debe ser competente en hematología de animales exóticos y llevará a cabo las pruebas estándares de validación de métodos. No todos los experimentos validación de métodos listados en la sección 2.1.2, son aplicables a la evaluación de los métodos de hematología manual para animales exóticos. Los experimentos de validación de métodos se deben seleccionar o modificar como sea necesario para asegurar que un nuevo método está funcionando satisfactoriamente para cumplir con los requisitos del laboratorio y las especificaciones del fabricante.

2.4.3. Instrumentación – vea también las Recomendaciones generales. El equipo (p. ej. hematocitómetro, cubreobjetos especial "weighted" para hematocitómetro, contadores manuales, pipetas calibradas, contador diferencial de células) utilizado para los procedimientos de hematología deben encontrarse en buen estado de trabajo. Deben llevarse a cabo y documentarse el monitoreo rutinario y el mantenimiento regular de cada pieza de equipo (p. ej. Calibración anual de pipetas y balanzas). Los reportes de mantenimiento, mal-funcionamiento y reparaciones deben ser mantenidos. Abbott Diagnostics, Inc. (Abbott Park, Illinois), utilizando analizadores hematológicos, como el Cell-Dyne 3500 u otros modelos mas avanzados, ha validado y apoya conteos automatizados en algunas especies no-mamíferas. Esta validación se ha llevado a cabo en los laboratorios de Sea World.

2.4.4. Conocimiento Del Personal. El personal de laboratorio debe estar capacitado para identificar células por especie. Un conocimiento completo de la variación

entre especies cuando se utiliza citometría de flujo es importante para entender cuando es que se requiere una verificación manual de los conteos.

2.4.5. Control de Calidad. Conteos manuales de WBC utilizando el hematocitómetro son imprecisos y tienen un coeficiente de variación de 20 a 40% (Schalm, Harr et al, 2005); por lo tanto la implementación de un control de calidad y análisis estadístico puede producir una significancia que no es relevante a la operación diaria. Los estudios de validación de métodos para especies de tiburones llevados a cabo por J. Arnold (2005) demostraron coeficientes de variación comparables la hematología manual para conteo de WBC de humanos, reportados en los folletos de instrucción insertados en los productos B-D para Unopette 365855, cuando las muestras fueron procesadas dentro de las primeras 5 horas de haberse recolectado.

a. **Reactivos y Materiales.** Los protocolos documentados para el conteo célular incluyendo conteos directos utilizando Metil Violeta (Natt & Herrick, 1952) para determinar el conteo total de RBC, WBC y plaquetas, el conteo directo sin tinción (Hawkey, 1988) o el método indirecto utilizando tinción de Phloxina B (Campbell, 1988) para contar únicamente WBC. En este último método, únicamente las células que contengan gránulos eosinofilicos se teñirán y el total de WBC se calcula basándose en el porcentaje de heterólfilos y eosinófilos del diferencial. Estudios reportados de validación de métodos entre técnicas directas e indirectas son causa de conflicto y requieren una mayor investigación, con un mayor número de especies representativas preferentemente siguiendo las guías de Westgard para la validación de métodos. La disparidad en los resultados puede deberse a la imprecisión de cada método. El diluente descrito por Natt and Herrick puede ser preparado en el laboratorio y es apropiado para todas las especies de vertebrados no-mamíferas, sin embargo, cuando dicho diluyente es utilizado para algunas especies de Cheloneas (tortugas) y elasmobranquios (tiburones, rajideos y rayas), se necesita que se le añaden sales para ajustar la osmolaridad de la solución madre o stock (Arnold, 2005). La técnica de Hawkey utiliza una Unopette para WBC de Becton Dickinson. El método de Campbell que utiliza Phloxina B como diluyente ya no está a disposición comercial como Unopette 5877 para eosinófilos, pero un diluyente similar puede ser preparado por el usuario.

b. **Actualmente, materiales de control preparados para el conteo de células sanguíneas de especies no-mamíferas no se encuentran a nivel comercial. Los controles de procedimientos incluyen:**

   i. Diluciones en duplicado de las muestras de pacientes, realizadas en un tiempo límite aceptable para asegurar la estabilidad de la muestra.

   ii. Estimar los WBC del frotis sanguíneo. Cada institución debe documentar un protocolo que alcance un método confiable para evaluar la exactitud de las cuentas del hematocitómetro. Estimar los valores totales de WBC

pueden ser difícil debido a la similitud de la morfología de los linfocitos y trombocitos observados a magnificaciónes bajas comúnmente utilizadas para estimar WBC de células de mamíferos.

c. **El examen de capacidad para tecnólogos** debe ser documentado anualmente, o con mas frecuencia según determinado por la institución. El examen debe incluir conteos comparativos provenientes de una misma muestra de sangre para el conteo total de células y para los diferenciales de leucocitos. La selección de la muestra debe ser representativa de la población de pacientes (aves, reptiles, teleostei, elasmobranchios, etc). Las cuentas hematocimétricas entre los tecnólogos deben coincidir en un 15% y los resultados de los porcentajes diferenciales para cada tipo de célula debe coincidir con un 95% de intervalo de confidencia.

Método de conteo celular directo — El error de plaquetas/linfocitos. Para tecnólogos recién entrenados o para tecnólogos con experiencia que hacen un diferencial en ciertas especies de animales, puede ser difícil de diferenciar entre plaquetas y linfocitos en el hematocitómetro. Una buena revisión del control de calidad es contando todas las células que no son eritrocitos en nueve cuadros grandes de la cámara y calcular el número total (este no es el valor actual y debe corregirse con el diferencial). Llevar a cabo el diferencial dos veces – incluye las plaquetas del primer diferencial y las excluye del segundo. Lo último se reporta como los resultados del valor real del diferencial. Utilizando el porcentaje de plaquetas del primer diferencial, calcule el valor absoluto y después restelo al número total para determinar el total de WBC. Ejemplo: Conteo en el hematocitómetro con una dilución de 1:100 = 750 células no-eritrocíticas; 750 × 1.1 × 100 = 82,500/µL del total del conteo de células no-eritrocíticas. El primer diferencial = Monocitos (1%), Linfocitos (9%), Heterófilos (8%) y Plaquetas (82%) así el valor absoluto de plaquetas = 0.82 × 82,500 = 67,650. El total de WBC = 82,500 – 67,650 = 14,850/µL.

2.4.6. Manual de Procedimientos – vea las Recomendaciones Generales
2.4.7. Comparación de las pruebas – vea las Recomendaciones Generales
2.4.8. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones Generales

2.5. Análisis de orina

2.5.1. Monitoreo – vea las Recomendaciones Generales
2.5.2. Validación de métodos – vea las Recomendaciones Generales. No todos los experimentos de validación de métodos listados en la sección 2.1.2 pueden ser aplicados a la evaluación de orina Los experimentos de validación de métodos deben seleccionarse y modificarse como sea necesario para asegurar que los nuevos métodos/analizadores estén funcionando satisfactoriamente y que

cumplan con los requisitos del laboratorio y las especificaciones del fabricante. Los procedimientos aplicables a la validación de métodos pueden incluir, pero no se limitan a, la comparación de los métodos, a la prueba de interferencia (particularmente como el color de la orina afecta la habilidad de leer los resultados en la tira reactiva o en los métodos automatizados) y posiblemente la detección de límites.

2.5.3. Instrumentación – vea las Recomendaciones Generales. La instrumentación utilizada en el examen de orina es limitada pero puede incluir lectores automáticos de tiras reactivas. Los lectores automáticos de tiras reactivas deben ser mantenidos y operados de acuerdo a las especificaciones del fabricante. Se deben hacer verificaciones del funcionamiento según necesario para asegurar la función precisa del instrumento.

2.5.4. Conocimiento del personal.

a. Entendiendo los efectos de la condición de la muestra en los parámetros de la prueba, p. ej. El efecto de hemoglobinuria en la determinación de proteína.
b. Conocimiento de cristaluria y hallazgos esperados específicos de especies.
c. Conocimiento de problemas comunes encontrados en muestras de orina en medicina veterinaria que puedan causar resultados erróneos, p. ej. Efectos de preservativos en los resultados de las pruebas, analisis químico de orina usando la cofiguracion para suero.
d. Conocimiento de la metodología de la tira reactiva utilizada en el laboratorio y interferencias comunes para dicho método.
e. Usos apropiados del criterio de repetición de las pruebas: Establecido por el laboratorio y basado en la significancia clínica de los valores de la prueba, p. ej. Identificación de cristales, confirmación de proteína por semicuantificación o cuantificación analítica, confirmación de glucosa. Se pueden requerir el uso de métodos de tabletas o pastillas cuando una orina intensamente pigmentada interfiere con la habilidad de la lectura de la tira reactiva. Incluya la documentación de re-evaluación en la hoja de trabajo y reporte o reporte corregido (si es necesario)

2.5.5. Control de Calidad – vea las Recomendaciones Generales

a. Pruebas/Ensayos

i. Pruebas físicas (apariencia [color, claridad], gravedad específica [estimada por refractometria])
ii. Pruebas químicas
1. Pruebas de tiras reactivas
2. Pruebas confirmatorias (glucosa [tableta], bilirrubina [tableta], cetonas [polvo o tableta], precipitación de acido sulfosalicílico para proteína)

b. Procedimientos de control de calidad para la tira reactiva y gravedad específica en la orina. Materiales de control para análisis de orina en humanos se encuentran disponibles para analizar la exactitud de las tiras reactivas. La

frecuencia de pruebas de CC en las tiras reactivas depende del número de procedimientos realizados por el laboratorio y puede variar desde CC diario hasta CC al abrir un nuevo frasco de tiras reactivas. La exactitud de los refractómetros debe ser monitoreada a intervalos regulares utilizando agua destilada (SG 1.000) (George, 2001).

c. Examinación microscópica del sedimento: estándarización del procedimiento

i. En la medicina veterinaria, la examinación del sedimento microscópico en muestras de orina requiere entrenamiento. Textos, tablas y posters de los elementos que conforman la orina en varias especies deben de ser accesibles para el analista. Los detalles de cómo se realilza el examen de orina y los resultados a reportar deben ser explicados o detallados en los SOP del laboratorio.

ii. Un volumen estándar de orina se utiliza para prepar el sedimento de orina (p.ej. 5 o 10 ml) dependiendo de la especie y la prueba requerida. Tubos cónicos para centrifugar debe centrifugarse a revoluciones por minuto (RPM) bajas, p.ej. 400-500g por 5 minutos. Una alta fuerza centrifuga relativa (RCF, por sus siglas en inglés) y excesivo tiempo de centrifugado destruye cilindros y elementos célulares. RCF = 1.118×10^{-5} x radio del brazo (cm) x revoluciones/min.

iii. El sobrenadante se remueve por decantación o utilizando una pipeta y se debe mantener un volumen constante del sobrenadante residual con el pellet (volumen de preferencia 0.5 ml). Los elementos célulares son resuspendidos mezclando suavemente.

iv. Se puede añadir una tinción al resuspender el sedimento y facilitar la identificación de su contenido. Un número consistente de gotas deben ser añadidas seguido por una mezcla suave. Un factor importante en los resultados finales es la dilución adicional de los elementos célulares causada por el volumen de la tinción. Alternativamente, un volumen de sedimento constante puede mantenerse reemplazando algo del volumen del sobrenadante por la tinción.

v. Dependiendo del tamaño del cubreobjetos, una o dos gotas de sedimento se transfieren a la laminilla de vidrio utilizando una pipeta. Es importante que el volumen del sedimento, el número de gotas de sedimento, y el tamaño cubreobjetos utilizado sean constantes dentro del laboratorio.

vi. Métodos alternativos de estándarización del sedimento de la orina están a disposición (p. ej. Rejillas para hacer mediciones volumétricas, métodos automatizados), sin embargo no son utilizados con frecuencia en medicina veterinaria. La adopción de una nueva metodología debe ser precedida por estudios de validación de métodos.

d. Examinación microscópica del sedimento: enumeración de elementos

i. El contenido del sedimento se examina a baja magnificación (x100 o Campo de bajo poder) seguido por una alta magnificación (sin aceite de inmersión) (x400 o Campo de alto poder) y raramente utilizando una magnificación con aceite de inmersión (x1000 o aceite). Varios formatos se han utilizado para reportar grados y cantidades de los elementos encontrados. El uso de números absolutos tiene muchas ventajas. Las cantidades bajas o altas de cada elemento observado en 10 campos o el promedio son reportadas. Alternativamente un sistema de grados de 0 a 3+ ó de 0 a 4+, puede ser utilizado si un criterio claro a usar es escrito para el uso del tecnólogo. Esta información también debe ser proveída a los clínicos o clientes. Los SOP para el sedimento de orina debe describir claramente los procedimientos para la examinación y el reporte de los contenidos del sedimento.

ii. Campo de bajo poder es utilizado para la enumeración de cilindros. Los cilindros son reportados como tipo y número por campo de bajo poder. El campo de bajo poder se puede utilizar para la evaluación general de la distribución de cristales, células epiteliales, y otros contenidos (moco, esperma, grasa, levaduras, etc.)

iii. Campo de alto poder es utilizado para reportar el número de eritrocitos, leucocitos y posiblemente cristales, células epiteliales y bacteria cuando están presentes en gran número.

iv. La magnificación con aceite de inmersión puede ser utilizada para reportar la concentración y morfología de bacteria u otros elementos celulares.

v. La observacion de microorganismos (p.ej. bacteria [cocos, barras], levaduras) en montajes húmedos teñidos o sin teñir debe confirmarse utilizando una tinción quick o una tinción de Gram ya sea directa o del sedimento concentrado de orina en una laminilla secada al aire.

2.5.6. Manual de procedimientos – vea las Recomendaciones Generales

2.5.7. Comparación de las pruebas – vea las Recomendaciones Generales

2.5.8. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones Generales

2.6. Citología

2.6.1. Monitoreo. El equipo y los reactivos utilizados para la preparacion y análisis de las muestras de citología deben mantenerse de manera consistente con las buenas prácticas de laboratorio como se detalló en las secciones de química clínica y hematología de estas pautas.

2.6.2. Validacion de Métodos – vea las Recomendaciones Generales. No todos los experimentos de validación de métodos listados en la sección 2.1.2 pueden ser aplicados a la evaluación de los métodos citológicos. Los experimentos de validación de métodos deben ser seleccionados y modificados como sea necesario para asegurar que los nuevos métodos/analizadores estén funcionando

satisfactoriamente para cumplir con los requisitos del laboratorio y las especificaciones del fabricante.

2.6.3. Instrumentación – vea las Recomendaciones Generales

2.6.4. Conocimiento del Personal de Laboratorio

a. El personal técnico del laboratorio debe ser capaz de examinar muestras a simple vista (p.ej. color y claridad del fluido) y llevar a cabo todas las pruebas relevantes (de rutina y especiales, p.ej. prueba de coagulación de mucina).

b. El personal de laboratorio debe tener conocimiento de los problemas comunes que se enfrentan al preparar una muestra, ademas de tener la habilidad de llevar a cabo los procedimientos necesarios para resolverlos.

c. La persona que interprete las muestras veterinarias, de preferencia un(a) patólogo(a) veterinario(a), debe tener documentación de que esta entrenado(a) en la evaluacion citopatológica y debe tener conocimiento de los hallazgos citologicos de todas las especies y tipos de muestras citológicas que se esperan en el laboratorio.

d. Si es necesario o se requiere, deben haber alternativas apropiadas para obtener una segunda opinión, revisión adicional o consulta con un(a) citopatólogo(a)

e. Se deben hacer esfuerzos para establecer una interpretación citológica acertada. Esto puede incluir pero no se limita a:

   i. Correlacionar los hallazgos con otras muestras citológicas o histológicas adicionales.

   ii. Seguimiento de la informacion acerca de la condicion del animal y/o respuestas a la terapia.

   iii. Evaluación de muestras citológicas seleccionadas por otro citólogo/citopatólogo para determinar si hay elementos que hayan sido pasados por alto, sobreinterpretados o subestimados.

   iv. Correlacionar con otras modalidades diagnósticas, p.ej. radiología, sonograma, cultivo microbiológico.

      1. El citopatólogo debe tener conocimiento con respecto a procedimientos complementarios.

      2. El citopatólogo debe revisar los aspectos técnicos del manejo y proceso de la muestra con el personal del laboratorio y dirigirlo como sea necesario.

      3. El citopatólogo debe de tener la habilidad de comunicar a los clientes asuntos importantes de los factores pre-analíticos, analíticos y post - analíticos.

      Esto puede incluir:

         i. Informacion respecto a la aceptabilidad de la muestra
         ii. Sugerir modificaciones de las técnicas
         iii. Pruebas adicionales
         iv. Diagnósticos o diagnósticos diferenciales
         v. Prognóstico o monitoreo

vi. Recomendaciones de tratamientos a un nivel basado en la experiencia o conocimiento. Si el citólogo/citopatólogo no tiene experiencia en opciones de tratamientos entonces debe instruir al cliente para consultar a un especialista.

2.6.5. Control de Calidad. – vea tambien las Recomendaciones Generales. Los citopatologos son un punto crítico para el control de calidad, ya que ellos observan la mayoría o todas las muestras citológicas y preparaciones del laboratorio, y también dependen de la fiabilidad de los productos del laboratorio para sus interpretaciónes y recomendaciones. Por lo tanto, la relación de trabajo entre el personal del laboratorio y el citopatólogo es crítica. El control de calidad debe ser apropiado para los tipos de muestras, tinciones y procedimientos incluidos como parte de la preparación y análisis citológico. Esto puede variar con cada laboratorio, tipo de preparación citológica y preferencias del citopatólogo. Conteo de células nucleadas proveniente de analizadores automáticos o por método manual (hematocitómetro) deben ser correlacionados con la densidad celular de la laminilla si es que frotis directos son hechos. El equipo utilizado para determinar el conteo de total de células nucleadas debe ser monitoreado como es hecho para el análisis hematológico (vease la sección de hematología)

2.6.6. Manual de procedimientos – vea las Recomendaciones Generales

2.6.7. Comparación de las pruebas – vea las Recomendaciones Generales

2.6.8. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones Generales

2.7. Pruebas de hemostasia (coagulación)

2.7.1. Monitoreo – vea las Recomendaciones Generales

2.7.2. Validación de Métodos – vea las Recomendaciones Generales. No todos los experimentos de validación de métodos listados en la sección 2.1.2 pueden ser aplicables a la evaluación de los analizadores de coagulacion. Los experimentos de validación de métodos deben ser seleccionados o modificados como sea necesario para asegurar que los nuevos métodos/analizadores estén funcionando satisfactoriamente para cumplir los requisitos del laboratorio y las especificaciones del fabricante.

2.7.3. Instrumentación – vea las Recomendaciones Generales

2.7.4. Conocimiento del personal – vea las Recomendaciones Generales

2.7.5. Control de calidad para coagulación – vea las Recomendaciones Generales

a. Pruebas/Ensayos

i. Conteo y estimación de plaquetas

ii. Morfología de plaquetas

iii. Pruebas de funcionamiento plaquetario (adhesión, agregación, secrecion, PFA100, BMBT, prueba de DNA [por sus siglas en inglés])

iv. Prueba de anticuerpo plaquetario

v. Tiempo parcial de tromboplastina activada (APTT, por sus siglas en inglés)
vi. Tiempo de protombina (PT)
vii. Tiempo de trombina (TT, por sus siglas en inglés) o Tiempo coagulación de trombina (TCT, por sus siglas en inglés)
viii. Concentración de fibrinógeno
ix. Prueba de factor de coagulación (funcional,DNA)
x. Prueba de factor de Von Willebrand (cantidad en ELISA, cualitativa en CBA, análisis de multímeros, BMBT, pruebas de función de plaquetas) , mutación específica de DNA
xi. Degradación de los productos de fibrina o fibrinógeno (DPF) y concentraciones de dimero-d
xii. Actividad antitrombina
xiii. Pruebas de proteina C y S
xiv. Tromboelastografía
xv. Prueba de generación de trombina
xvi. Prueba de fibrinólisis

b. Recomendaciones

i. Los laboratorios individuales deben definir las horas de operacion y/o turnos de forma que se acomoden las pruebas de coagulación. Para los estudios de tromboelastografía la prueba debe se preestablecida con anticipación.
ii. Instrumentos manuales deben calibrarse regularmente de acuerdo a las recomendaciones del fabricante. Si un CC electronico esta disponible entonces debe de realizarse de acuerdo alo recomendado por el fabricante. Controles de calidad externos son recomendados cuando hay un cambio en el lote de reactivos, rotor, etc, un cambio o daño al equipo, o cualquier preocupación clínica. Para instrumentos de mesa, si se pide un perfil de coagulación cada turno laboral al menos 1 nivel de material de control en el equipo debe correrse en cada corrida. Esto debe llevarse a cabo previamente o simultáneamente junto con las muestras a probar.
iii. Las muestras de pacientes y controles pueden ser probadas en duplicado
iv. Los datos se expresan en % de la muestra conjunta; los intervalos son frecuentemente proporcionados y el % derivado del control es utilizado

2.7.6. Manual de procedimientos – vea las Recomendaciones Generales
2.7.7. Comparación de pruebas – vea las Recomendaciones Generales
2.7.8. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones Generales

2.8. Pruebas de compatibilidad sanguínea

2.8.1. Monitoreo – vea las Recomendaciones Generales
2.8.2. Validación de métodos – vea las Recomendaciones Generales. No todos los experimentos de validación de métodos listados en la sección 2.1.2 pueden ser

aplicables a la evaluación de los métodos de pruebas de compatibilidad cruzada. Los experimentos de validación de métodos deben ser seleccionados o modificados como sea necesario para asegurar que los nuevos métodos/analizadores estén funcionando satisfactoriamente para cumplir los requisitos del laboratorio y las especificaciones del fabricante.

2.8.3. Instrumentación – vea las Recomendaciones Generales
2.8.4. Conocimiento del personal – vea las Recomendaciones Generales
2.8.5. Control de Calidad – vea las Recomendaciones Generales

a. Pruebas/Ensayos
   i. La prueba de compatibilidad cruzada mayor consiste en probar el suero/plasma del paciente con una suspensión salina de glóbulos rojos del donante.
   ii. La prueba de compatibilidad cruzada menor, disponible cuando se ha enviado sangre completa del donante, consiste en probar una suspensión salina de glóbulos rojos del paciente con suero/plasma del donante.

b. Recomendaciones
   i. Si se utiliza suero para la prueba de compatibilidad cruzada, entonces el suero debe ser separado de los glóbulos rojos tan pronto como sea posible después de que la muestra haya coagulado. Las muestras deben ser examinadas para determinar la presencia de hemólisis, y darles un grado de hemólisis de 1+ (leve) y hemólisis 4+ (severa). Muestras de suero (o plasma) con 3+ o 4+ de hemólisis deben ser rechazadas, sin embargo un criterio más riguroso de rechazo de hemólisis 1+ puede ser utilizado. Suero/plasma hemolizado puere enmascarar una reacción hemolítica de incompatibilidad (Lippi, 2006; Giger, pers. Communication)
   ii. Evalúe autocontroles del paciente y donante para asegurar que los reactivos, como el diluente y el equipo estén funcionando adecuadamente. Los autocontroles deben ser manejados en paralelo y de la misma manera que las muestras para las pruebas de compatibilidad cruzada mayor y menor.
      1. El autocontrol del paciente consiste de suero/plasma separado del paciente y una suspencion salina de glóbulos rojos lavados del paciente
      2. Cuando sangre del donante es enviada, el autocontrol del donante consiste de suero/plasma separados del donante y una suspensión salina de glóbulos rojos lavados del donante.
   iii. Evite mezclar/agitar y golpear demasiado, ya que esto puede separar agrupaciones frágiles de glóbulos rojos (aglutinados) y esto puede producir resultados negativos falsos .
   iv. Formaciones fuertes de Roleaux pueden imitar una aglutinación verdadera. Se puede realizar una dilución con solución salina para dispersar la formación rouleaux.

v. Resultados positivos falsos pueden ocurrir cuando no se lava adecuadamente.

vi. Resultados positivos falsos pueden ocurrir cuando se hace compatibilidad cruzada debido a que el plasma puede contener pequeñas formaciones de coágulos de fibrina que pueden resultar en pseudoaglutinación.

vii. Resultados negativos falsos pueden ocurrir secundariamente en suspensiones de glóbulos rojos que estén muy diluidas o muy concentradas.

2.8.6. Manual de Procedimientos– vea las Recomendaciones Generales**.** Los procedimientos para la prueba de compatibilidad cruzada pueden variar con el laboratorio y especies. Recomendaciones específicas para un protocolo se encuentran mas alla del alcance de estas pautas. El establecimiento de procedimientos de compatibilidad cruzada o la adopción de métodos de otro laboratorio de confianza es recomendado.

2.8.7. Comparación de pruebas – vea las Recomendaciones Generales

2.8.8. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones Generales

2.9. Radioinmunoanálisis (RIA)

2.9.1. Reglamentaciones Gubernamentales para RIA. Las reglamentaciones gubernamentales y los requisitos de licencia pueden variar de acuerdo a la ciudad, estado, provincia y pais. En general, se indican un mínimo de requisitos para el manejo seguro de radioisotopos. Los requisitos incluyen un entrenamiento de seguridad para el personal, monitoreo de isotopos radioactivos, desecho apropiado de radioisotopos e inspección periódica. Se requiere de una licencia para la compra de isotopos radioactivos. El laboratorio que considere llevar a cabo RIAs debe determinar si cumple con estos estándares y obtener la licencia antes de establecer estos procedimientos.

2.9.2. Monitoreo – vea las Recomendaciones Generales

2.9.3. Validación de Métodos. Cualquier radioinmunoanálisis debe ser validado para la especie para la que se va a utilizar. La validación debe incluir uno de los métodos listados abajo.

a. Se deben evaluar los artículos en publicaciones veterinarias arbitradas (con revisores externos) que cubren el tema de una prueba en particular (si esta disponible). No es una buena práctica en solo confiar en las pruebas/datos proveidos por el fabricante. La prueba debe ser validada independientemente.

b. Si la prueba no se puede verificar o corroborar a través de una validación independiente, entonces un mínimo de evaluaciones es necesario:

i. Precisión de corrida a corrida – un mínimo de 10 puntos de datos. 20 puntos de datos pueden mejorar la exacitud del estimado.

ii. La precisión entre corridas - un mínimo de 10 puntos de datos. 20 puntos de datos pueden mejorar la exacitud del estimado.

iii. Procedimientos de recuperación – cuando sea posible, use una substancia natural purificada por cada especie. La recuperación debe llevarse a cabo utilizando muestras con concentraciones altas y bajas.

iv. Evaluación de substancias o procesos de interferencia como hemólisis, lipemia, bilirrubinemia, interacciones entre medicamentos, etc.

v. Paralelismo – diluciones y detalles de linearidad.

vi. Intervalos de referencia deben generarse y ser mantenidos para cada prueba. Por favor referirse a las Pautas para los Intervalos de Referencia y Umbrales de Decisión.

vii. Las curvas estándar son necesarias para cada prueba. Algunos contadores gamma pueden almacenar las curvas. Si esto se implementa en las pruebas de rutina, la validación del procedimiento debe estar presente.

2.9.4. Instrumentación – vea las Recomendaciones Generales

2.9.5. Conocimiento del personal – vea las Recomendaciones Generales

2.9.6. Control de Calidad

a. Un mínimo de 3 materiales de contrrol deben ser ensayados con cada prueba. Esto puede incluir controles comerciales para valores altos, normales y bajos o muestras desarrolladas internamente.

b. La interpretación de los resultados de RIA a menudo depende de la metodologia y de los valores de referencia establecidos internamente, haciendo difícil el uso de algunos tipos de sistemas de control externo. Se recomienda que cuando se utilizen materiales de control externo que materiales internos tambien se analizen y que se compare la interpretación.

c. Los controles externos deben ser usados y graficados al menos trimestralmente.

d. Todos los resultados de material de control deben ser documentados, y las gráficas y los valores deben estar al acceso del personal que corre estas pruebas. Las gráficas Levy-Jennings son aceptables.

e. Un plan de acción debe estar disponible con detalles de aceptación o rechazo de los resultados obtenidos de las pruebas de paciente, basando en los valores de control.

f. Si el procedimiento, según detallado por el fabricante o en artículos publicados, es modificado (por ejemplo, solo 1 tubo por paciente) entonces una documentación debe estar a disposición para demostrar que la precisión y exactitud de la prueba son todavía aceptables con la modificacion(es).

2.9.7. Manual de Procedimientos – vea las Recomendaciones Generales

2.9.8. Comparación de los resultados de la prueba – vea las Recomendaciones Generales

2.9.9. Identificación de pruebas externas – vea las Recomendaciones Generales

3. Factores Postanalíticos de importancia en Patología Clínica Veterinaria

3.1. Revisión de datos. El laboratorio debe establecer un procedimiento para revisiones por dos técnicas(os) apropiadas(dos), la revisión del supervisor y/o la revisión del patólogo de las muestras y/o resultados. La revisión puede ser específica para pruebas con problemas, parámetros por tipo de muestra y/o significancia clínica de los resultados de la prueba.

3.2. Registro de Datos y Reporte. Los reportes deben ser precisos no importa si son creados a mano o electrónicamente en una base de datos. Los datos deben presentarse en una forma estándar según establecida por el laboratorio. Si se conoce de alguna inexactitud de significancia clínica, los resultados deben definir claramente el error o no deben ser reportados.

3.3. Generación del reporte. Los reportes deben de estar en un formato que sea fácil de leer y de entender con las referencias apropiadas o explicaciones según sean necesarias. Los componentes preanalíticos y analíticos del reporte deben generarse a tiempo de manera oportuna. El laboratorio debe mantener una copia de todos los reportes así como de cualquier hoja de datos que lo acompañen. Los reportes deben rubricar y fecharse por el técnico o patólogo a cargo de realizar o interpretar alguna parte del el proceso.

3.3.1. Identificación de pruebas externas: Los clientes deben ser informados de que pruebas van a ser remitidas a otros laboratorios.

3.3.2. Cualquier resultado que sea posiblemente inexacto debe ser acompañado por comentarios claros y fáciles de ver por el clínico. Estos comentarios deben indicar que esos resultados pueden ser inexactos, enagañosos y detallar la razón de esta interpretación.

3.4. Envío del Reporte. El envío del reporte debe ser oportuno para el cliente, enviado al cliente correcto, y en la forma según acordada entre el cliente y el laboratorio.

3.5. Almacenamiento de la Muestra. La muestra debe ser almacenada bajo condiciones apropiadas por un periodo de tiempo pre-establecido, determinado por la estabilidad de la muestra, las políticas del laboratorio y/o requisitos de certificación/acreditación. Las laminillas teñidas para microscopia pueden mantenerse indefinidamente, sin embargo muestras como las de orina, sangre, o fluidos de alguna cavidad tienen un tiempo limitado de almacenamiento. En general, las muestras de hematología de aves no deben ser guardadas (incluyendo transporte) por un periodo mayor a doce horas mientras que las muestras de reptiles pueden ser guardadas por 24 horas. Las muestras de sangre pueden ser congeladas a -20ºF para el análisis de DNA y -70ºF para el análisis de RNA (por sus siglas en inglés). Las muestras en congeladores libres de escarcha pueden degradarse por repetidos ciclos de deshielo.

3.6. Desecho de las Muestras. Los laboratorios deben desechar apropiadamente y de manera segura, los materiales y muestras biológico-peligrosas y no peligrosas. Esto incluye vaciar a tiempo todos los contenedores y bolsas de basura...

3.7. Seguridad del Personal – vea las recomendaciones Preanalíticas

3.8. Ambiente del Laboratorio Una vez completado un procedimiento, el espacio del laboratorio debe estar limpio y organizado para prepararse para los siguientes procedimientos. El equipo debe estar en buenas condiciones de mantenimiento para que esté listo a cualquier hora. Véase la sección de Pre analítica para recomendaciones adicionales.

3.9. Requisitos del Personal – vea la sección de Pre analítica

3.10. Miscelánea. Una vez que los análisis de laboratorio sean finalizados, se deben evaluar los reactivos y el inventario, así artículos vacios/acabados deben ser solicitados. Un buen sistema de inventario y lista de los proveedores aprobados asegura que la calidad de los materiales estará disponible a toda hora.

Referencias

Enlaces

www.aacc.org	American Association for Clinical Chemistry; also found here the DACC - Division of Animal Clinical Chemistry
www.aavld.org	American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians
www.acvim.org	American College of Veterinary Internal Medicine
www.acvp.org	America College of Veterinary Pathologists
www.asvcp.org	American Society for Veterinary Clinical Pathology
www.avma.org	American Veterinary Medical Association
www.bloodgas.org	
www.clsi.org	Clinical and Laboratory Standards Institute; formerly known as NCCLS
www.esvcp.com	European College/Society of Veterinary Clinical Pathology
www.isacp.org	International Society for Animal Clinical Pathology
www.labtestsonline.org	
www.scireg.com	Science & Regulatory Consultants
www.sqa.org	Society of Quality Assurance
www.toxpath.org	Society of Toxicologic Pathology
www.westgard.com	Westgard QC

Regulatory Agencies

www.fda.gov	US Food and Drug Administration
www.cdc.gov/clia	Clinical Laboratory Improvement Ammendments

http://wwwn.cdc.gov/clia/regs/toc.aspx Current CLIA Regulations (2004)
http://wwwn.cdc.gov/clia/pdf/42cfr493_2004.pdf Part 493 Laboratory Requirements
http://www.gpoaccess.gov/cfr/index.html Alternative site for Part 493 (CFR)

Publicaciones

1. Good Laboratory Practice Regulations for Nonclinical Laboratory Studies Guidelines. Title 21 Code of Federal Register, subchapter A, part 58. Federal Drug Administration (FDA), US Dept. of Health and Human Services (USHHS)
http://www.nal.usda.gov/awic/legislat/21cfr97.htm
2. Environmental Protection Agency, Good Laboratory Practice Standards: 40 CFR part 792 (Toxic Substance Control Act) http://law.justia.com/us/cfr/title40/40-31.0.1.1.3.html
3. Environmental Protection Agency, Expert in Laboratory Management; Quality Assurance/Control: 40 CFR part 160 (Federal Insecticide, Fungicide, and Rodenticide Act)
http://www.intota.com/expert-consultant.asp?bioID=605165&perID=717458
4. Guidance for Industry, E6 Good Clinical Practice: Consolidated Guidance. USHHSFDA. Covering recent topics such as Immunotoxicology Evaluation of Investigational New Drugs, General Principles of Software Validation, Bioanalytical Method Validation, and Part 11, Electronic Records; Electronic Signatures -- Scope and Application.
http://www.fda.gov/cder/guidance/959fnl.pdf
5. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, NIH Publication No. 86-23, Revised 1996.
http://www.nap.edu/catalog.php?record_id=5140
6. Office of Laboratory Animal Welfare website
http://grants.nih.gov/grants/olaw/references/phspol.htm

Artículos Referidos

1. Adcock D, Kressin D, Marlar RA. 1998. The effect of time and temperature variables on routine coagulation tests. Blood Coagul Fibrinolysis 9:463–470.
2. Adcock DM, Kressin DC, Marlar RA.1998. Minimum specimen volume requirements for routine coagulation testing: dependence of citrate concentration. Am J Clin Pathol 09:595–599.
3. Albasan H, Lulich JP, Osborne CA, et al. Effects of storage time and temperature on pH, specific gravity, and crystal formation in urine samples from dogs and cats. J Amer Vet Med Assoc 2003;222:176-179.
4. Allen TA, Jones RL, Purvance J. Microbiologic evaluation of canine urine: direct microscopic examination and preservation of specimen quality for culture. J Am Vet Med Assoc 1987;190(10):1289-1291.

5. Arnold, J. Hematology of the Sandbar shark, *Carcharhinus plumbeus*: standardization of complete blood count techniques for elasmobranchs. J Vet Clin Path; 2005; 34:115-123.
6. Arnold, J. White blood cell count discrepancies in Atlantic loggerhead sea turtles: Natt-Herrick vs. Eosinophil Unopette®. Proc Assoc Zoo Vet Tech Conf. 1994:15-26.
7. Arnold, J., Gargan, C, Belovarac, J. Method Validation Study for Total White Blood Cell Counts: Natt-Herrick versus Eosinophil Unopette ® Methods. Proc Assoc Zoo Vet Tech Conf. 2007: 49.
8. Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. Lancet 1986; i:307-310.
9. Bonini P, Plebani M, Ceriotti F, Rubboli F. 2002. Errors in laboratory medicine. Clin Chem 48:691–698.
10. Boral L, JB Henry. The Crossmatch. In: Clinical Diagnosis and Management by Laboratory Methods. Bernard and Henry, 18th ed. 1991.
11. Carter JM, Klausner JS, Osborne CA, Bates FY. Comparison of collection techniques for quantitative urine culture in dogs. J Amer Vet Med Assoc 1978;173(3):296-8.
12. Dale JC, Novis DA. 2002. Outpatient phlebotomy success and reasons for specimen rejection. Arch Pathol Lab Med 126:416–419.
13. Dein, FJ, Avian Leukocyte Counting Using the Hemacytometer, J Zoo Wild Anim Med;1994; 25:3.
14. Fiebig EW, Etzell JE, Ng VL. 2005 Clinically relevant differences in prothrombin time and INR values related to blood sample collection in plastic vs glass tubes. Am J Clin Pathol 124:902–909.
15. Friedrichs KR, Young KM. Using an independent quality control software program, EZRuns, to monitor quality control procedures for a bench-top coagulation analyzer. Veterinary Clinical Pathology 2005; 34(3):218-223
16. George JW. Refractometers in veterinary laboratory medicine: an historical and technical review. Vet Clin Pathol 2001;30:201-210.
17. Glick, M., Ryder, K., & Glick, S. Interferographs: User's Guide to Interferences in Clinical Chemistry Instruments. 1991. Indianapolis, IN: Science Enterprises, Inc.
18. Goulden BE. Assessment of the usefulness of the examination of a gram smear of fresh uncentrifuged urine in the determination of significant bacteriuria in dogs. N Z Vet J 1968;16(1-2):1-2.
19. Harr KE, Raskin R, Heard DJ. 2005. Temporal Hematologic and Biochemical Effects of Three Commonly Used Anticoagulants on Macaw (*Ara* sp.) and Burmese Python (*Python molurus bivittatus*) Blood. Vet Clin Pathol. 34(4):383-388.
20. Hegstad-Davies, RL. 2006. A review of sample handling considerations for reproductive and thyroid hormone measurement in serum or plasma. Theriogenology. 66(3):592-598.
21. Hyloft-Peterson P, Stöckl D, Blaabjerg O, Petersen B, Birkemose E, Thenpont L, Flensted Lassen J, Kjeldsen J. Graphical itnerepretation of analytical data from comparison of a field method with a reference method by use of difference plots (opinion). Clinical Chemistry. 1997; 43:2039-2046.

22. Jensen AL, Kjelgaard-Hansen M. Method comparison in the clinical laboratory. Veterinary Clinical Pathology 2006; 35(3):276-286.
23. Kratz A, Stanganelli N, Van Cott EM.2006. A comparison of glass and plastic blood collection tubes for routine and specialized coagulation assays: a comprehensive study. Arch Pathol Lab Med 130:39–44.
24. Lippi, G, Franchini, Montagnana, M, et al., 2006. Quality and reliability of routine coagulation testing: can we trust that sample? Blood Coagula Fibrinolysis 17:1-7.
25. Natt MP, Herrick, CA. New blood diluent for counting the erythrocytes and leucocytes of the chicken. Poult Sci. 1952; 31:735-738.
26. Osborne CA, Stevens JB. Urinalysis: A clinical guide to compassionate patient care. Shawnee Mission, KS: Bayer Corporation;1999:17-24, 51-62, and 125-131.
27. Padilla J, Osborne CA, Ward GE. Effects of storage time and temperature on quantitative culture of canine urine. J Amer Vet Med Assoc 1981;178(10):1077-81.
28. Rabinovitch A, Arzoumanian L, Curcio KM, Dougherty B, Halim A. Urinalysis – approved guideline, 3rd ed. Clinical and Laboratory Standards Institute document GP16-A3, 2009.
29. Raskin RE, Murray KA, Levy JK. Comparison of home monitoring methods for feline urine pH measurement. Vet Clin Path 2002;31:51-55.
30. Stöckl D, Dewitte K, Thienpont M. Validity of linear regression in method comparison studies: limited by the statistical model of the quality of the analytical data? *Clinical Chemistry.* 1998; 44(11):2340-2346
31. Sturgess, CP, Hesford A, Owen H and Privett R. An investigation into the effects of storage on the diagnosis of crystalluria in cats. J Fel Med Surg 2001;3:81-85.
32. Swenson CL, Boisvert AM, Kruger JM, gibbons-Burgener SN. Evaluation of modified Wright-staining of urine sediment as a method for accurate detection of bacteriuria in dogs. J Amer Vet Med Assoc 2004;224(8):1282-9.
33. Tietz NW. A model for a comprehensive measurement system in clinical chemistry. *Clinical Chemistry.* 1979; 25(6):833-839.
34. Valenstein PN, Sirota RL. 2004. Identification errors in pathology and laboratory medicine. Clin Lab Med 24:979–996.
35. Westgard JO, Cary RN, Sold S. Criteria for judging precision and accuracy in method development and evaluation. *Clinical Chemistry.* 1974; 20(7):825-833.

Libros/Capítulos

1) Belford, C. and Lumsden, J.H. Cytopathology. In: Manual of Small Animal Clinical Pathology. Davidson, M, Else, R.E. and Lumsden, J. (eds). British Small Animal Veterinary Association, Cheltenham, 2998.
2) Bellamy JEC, Olexson DW. Quality Assurance Handbook for Veterinary Laboratories. Ames, IA. Iowa State University Press, 2000:101 pages total.
3) Burtis CA, Ashwood ER, Bruns D, eds. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry,* 4th ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2005.
4) Campbell, TW. Avian Hematology. In: *Avian Hematology and Cytology*. Ames, IA: Iowa State University Press; 1988:6-13.

5) Cowell RL, Tyler RD, Meinkoth JH and DeNicola D. *Diagnostic Cytology and Hematology of the Dog and Cat*, 3rd ed. St. Louis, MO: Mosby, Inc.; 2007.
6) Day M, Mackin A, Littlewood J, eds. *Manual of Canine and Feline Haematology and Transfusion Medicine.* Quedgeley, Gloucester, UK: British Small Animal Veterinary Association; 2000.
7) Feldman BF, Zinkl JG, Jain NC, ed. *Schalm's Veterinary Hematology* 5th ed. Malden, MA; Blackwell; 2000.
8) Freeman, K.P. Veterinary Cytology: Dog, Cat, Horse and Cow. Manson Publishing/The Veterinary Press, London; 2008.
9) Fudge AM, ed. *Laboratory Medicine: Avian and exotic pets.* Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2000.
10) Harvey JW. *Atlas of Veterinary Hematology: Blood and bone marrow of domestic animals.* Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001.
11) Hawkey, C. M, Clinical Laboratory Medicine: The value of clinical hematology in exotic birds, *Exotic Animals*, Jocobson, Kollias, Churchill Livingstone; 1988.
12) Kaneko JJ, Harvey JW, Bruss ML, eds. *Clinical Biochemistry of Domestic Animals* 6th ed. San Diego, CA: Academic Press; 2008.
13) Latimer KS, Mahaffey EA, Prasse KW. *Veterinary Laboratory Medicine: Clinical Pathology* 4th ed. Malden, MA; Wiley-Blackwell; 2003.
14) Linnet K, Boyd JC. Selection and analytical evaluation of methods—with statistical techniques. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds.) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics*. 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2006:353-407
15) Loeb WF, Quimby FW, eds. *The Clinical Chemistry of Laboratory Animals* 2nd ed. Philadelphia, PA: Taylor & Francis; 1999.
16) Meyer DJ, Harvey JW. *Veterinary Laboratory Medicine: Interpretation & diagnosis.* 2nd. ed. Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 1998.
17) Osborne CA, Stevens JB. *Urinalysis: A Clinical Guide to Compassionate Patient Care.* Shawnee Mission, KS: Bayer Corporation, Agricultural Division, Animal Health; 1999.
18) Raskin RE, Meyer DJ. *Atlas of Canine and Feline Cytology.* Philadelphia, PA: WB Saunders Company; 2001.
19) Reagan WJ, DeNicola DB, Irizarry Rovira A. *Veterinary Hematology: Atlas of common domestic species,* 2nd ed. Malden, MA: Blackwell Publishing: 2008.
20) Stockham SL, Scott MA. *Fundamentals of Veterinary Clinical Pathology*, 2nd ed Walden, MA: Wiley-Blackwell; 2008.
21) Thrall, MA et al. *Veterinary Hematology and Clinical Chemistry.* Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2004.
22) Westgard JO. *Basic QC Practices Training in Statistical Quality Control for Healthcare Laboratories.* 2nd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2002.
23) Westgard, JO. Method validation: the experimental plan. In: Westgard. JO, ed. *Basic Method Validation*, Madison, WI: Westgard QC; 1999:48-55.

24) Westgard JO, Klee GC. Quality management. In Burtis CA, Ashwood ER, Bruns DE (eds.) *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics.* 4th ed.Philadelphia, PA: Elsevier Inc.; 2006:485-529.

25) (a)Westgard JO, Quam E. Method validation: the linearity or reportable range experiment. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*, 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:102-112.

(b)Westgard JO. Method validation: the decision on method performance. In Westgard JO (ed.). *Basic Method Validation*. 3rd edition. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:188-196.

(c)Westgard JO. Method validation: the replication experiment. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation.* 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:114-122.

(d)Westgard JO. Method validation: the comparison of methods experiment. In Westgard JO (ed.). Basic Method Validation. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:124-136.

(e)Westgard JO. Method validation: statistical sense, sensitivity, and significance. In Westgard JO (ed.). *Basic Method Validation.* 3rd ed. Madison WI: Westgard QC, Inc.; 2008:138-152.

(f)Westgard JO. Method validation: the interference and recovery experiments. In *Basic Method Validation*. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:154-166.

(g)Westgard JO. Method validation: the detection limit experiment. In Westgard JO (ed.) *Basic Method Validation*. 3rd ed. Madison, WI: Westgard QC, Inc.; 2008:168-176.

26) Westgard JO. What are control materials and what characteristics are important? In Westgard JO (ed.) Basic QC Practices. 1st ed. Madison,WI: Westgard QC, Inc.;1998:33-46.

27) Wied, G. L., Bibbo, M. and Keeb ler, C.M. Diagnostic Quality Assurance in Cytopathology. In: Comprehensive Cytopathology, 2nd ed. Bibbo, M. (ed). W.B. Saunders Co, London, 1997.

Revistas – Las referencias generales que frecuentemente contienen información relevante de control de calidad.

1) Clinical Chemistry, official publication of the American Association of Clinical Chemistry
2) Journal of Feline Medicine Surgery
3) Journal of the American Veterinary Medical Association
4) Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, official publication of the American Association of Veterinary Laboratory Diagnosticians
5) New Zealand Veterinary Journal
6) Toxicologic Pathology, official publication of the Society of Toxicologic Pathology
7) Veterinary Clinical Pathology, official publication of the American Society for Veterinary Clinical Pathology and the European Society for Veterinary Clinical Pathology

8) Veterinary Pathology, official publication of the American College of Veterinary Pathologists

Contributors to the original guidelines and past and present members of the Quality Assurance and Standards Committee

Dr. Jim Bellamy
Pat Benson
Karen Curd
Dr. Jean Dodds
Dr. Ellen Evans
Dr. Susan Friend
Sue Gallagher
Karen Getzy
Julie Gruenwaldt
Dr. James Klaassen
Dr. Sally Lester
Dr. Peter Lording
Dr. John Lumsden
Mike Mahoney
Dr. Larry McGill
Dr. Joanne Messick
Pam Miller
Dr. Scott Moroff
Dr. Fran Moore
Loretta Moore
Dr. Karen Russel
Dr. Carolyn Sink
Dr. Linda Vap
Dr. Gail Walter
Dr. Ellen Ziemer

Current and past members contributing to the revisions and additions to these Guidelines, 2008

Jill Arnold
Kirstin Barnhart
Julia Blanco
Rebecca Davies
Deborah Davis
Bente Flatland
Kathy Freeman
Kristen Friedrichs
Rebekah Gunn-Christie
Kendal Harr
Helen Kocmarek

David Korcal
Jim Matthews
Joanne Messick
Renee Pearson
Shannon Pedersen
Connie Peterson
Kristiina Ruotsala
Lynne Shanahan
Balazs Szladovits
Linda Vap

Contributing to this Spanish translation, 2010
Julia Blanco
Armando Irizarry