

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

Revisión 2006: Finalizada en la Reunión del ACVP, Monterrey, CA, Diciembre 2009 2

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

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

1.1.1. Recolección de Especímenes, Manejo y Transporte al Laboratorio. La información 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 frío durante su transporte al laboratorio.
- ii. Muestras con anticoagulante para hematología que a simple vista se encuentren con macro-coágulos produzcan resultados con errores variables. La clínica debe ser contactada ya sea por escrito o por teléfono e informada de que la muestra va a producir resultados erróneos. 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 apropiada 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 una 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 zoonóticas. 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 funcionando apropiadamente. 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 áreas 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 implementación, 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 más 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 reaccionan 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 zoonóticas incluyendo Chlamydomphila, 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 cistocentesis, 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 urinalisis. 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 frotos, 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 frotos 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 frotos directos de las muestras de fluidos deben hacerse antes de realizar cualquier procedimiento de concentración o de fijación. Los frotos pueden teñirse o dejarse sin teñir y enviarse junto con la muestra de fluido. Esto permitirá la estimación del conteo celular 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 celular corresponda razonablemente con las estimaciones hechas en dicho(s) frotis(es). Esta práctica también evita que la densidad celular 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 2-8°C. El plasma entonces debe separarse de las 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 (2-8°C) 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 °C. (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 vez 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 4°C. 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 día y la hora en que se sometieron las muestras, y con la identificación del paciente y del donante. 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 diagnóstico veterinario. Una descripción más 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 estadísticos expresando la cercanía de los resultados del laboratorio con la media del resto del grupo.
 - iii. Las medias deben ser calculadas y analizadas basándose 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 rápidamente.

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 sustancias utilizadas. Los intervalos de referencia y los procedimientos de control de calidad para el nuevo método se deben determinar antes de que se

inicien las 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 soluciones son recomendados y se pueden preparar como indicado. Las soluciones 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 analice 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 lineal 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 lineal.

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 soluciones 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 sistemático (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 lineal 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 (X_c) puede determinarse calculando el valor de “y” (Y_c) proveniente de la regresión lineal

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

- 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 $\frac{1}{2}$ de los resultados por arriba y $\frac{1}{2}$ 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 sustancias 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 está interfiriendo con el método. (Westgard, 2008f). Entre las sustancias 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 sustancias 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 (soluciones comerciales disponibles) y bilirrubina (soluciones 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 estadística “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 sustancias 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 sustancia dentro de la matriz de la muestra reacciona 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. Soluciones 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 reacciones 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:

$$\text{Concentración estándar añadida} \times (\text{ml std d/ml std añadido} + \text{ml muestra})$$

- 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 $[100\% - \text{recuperación } \%]$.

vi. El criterio para un funcionamiento aceptable es $SE_{\text{meas}} < TE_a$. 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 una 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 estimaciones 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 las 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 linealidad
- ii. Precisión
- iii. Exactitud
- iv. Especificidad analítica - Medición del compuesto de interés. Esto debe dar un estimado y definir claramente cualquier sustancia 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 específicas 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 sustancias 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 procedimientos 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 T_{ea} 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 aceptable.
- 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 significativamente 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, semanal, 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 Envío
 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. Información 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 sensibilidad 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 información 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 rápido” (Cheat sheets)
 - Pautas de referencia rápida
 - 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 más 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 (bianaual) 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 lineal.

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 día 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 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 $>20,000/\mu\text{L}$ 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 celular (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 celular 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 eosinofílicos se teñirán y el total de WBC se calcula basándose en el porcentaje de heterófilos 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 diluyente 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 magnificaciones 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 confianza.

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; $750 \times 1.1 \times 100 = 82,500/\mu\text{L}$ 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 = $0.82 \times 82,500 = 67,650$. El total de WBC = $82,500 - 67,650 = 14,850/\mu\text{L}$.

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, análisis químico de orina usando la configuración 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 ácido 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: estandarización 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 realiza 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 preparar 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 centrífuga relativa (RCF, por sus siglas en inglés) y excesivo tiempo de centrifugado destruye cilindros y elementos celulares. $RCF = 1.118 \times 10^{-5} \times \text{radio del brazo (cm)} \times \text{revoluciones/min.}$
- 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 celulares 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 celulares 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 estandarización 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 observación 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 preparación 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. 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 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, además 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 está entrenado(a) en la evaluación citopatológica y debe tener conocimiento de los hallazgos citológicos 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 información acerca de la condición 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 tener la habilidad de comunicar a los clientes asuntos importantes de los factores pre-analíticos, analíticos y post-analíticos.
- Esto puede incluir:
- i. Información 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 también las Recomendaciones Generales. Los citopatólogos 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 interpretaciones 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 coagulación. 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, secreción, 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 puede 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 diluyente 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 suspensión 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 país. 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 exactitud del estimado.

- ii. La precisión entre corridas - un mínimo de 10 puntos de datos. 20 puntos de datos pueden mejorar la exactitud 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 linealidad.
- 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 control 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 metodología 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 utilicen materiales de control externo que materiales internos también se analicen 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 modificación(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, engañosos 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 -20°F para el análisis de DNA y -70°F 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 vacíos/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	American 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 Amendments

<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. Alban 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 Pathol*; 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 interpretation 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*, Jacobson, 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 Keebler, 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