Parque Tecnológico de Valencia c.Benjamín Franklin 5-11
46980E Paterna Valencia España 961366090 fax 961318008
e-mail info@ainia.es www.ainia.es

CONTROL DE CALIDAD INTERNO EN LABORATORIOS DE MICROBIOLOGIA

David Tomás Fornés
dtomas@ainia.es

1.- INTRODUCCIÓN

La Norma UNE-EN ISO 17025:2005 (punto 5.9) indica que el laboratorio debe tener procedimientos de control de calidad para realizar el seguimiento de la validez de los ensayos (...)

El control de calidad debe realizarse de tal forma que permita detectar tendencias y aplicar técnicas estadísticas para la revisión de los resultados.

Dicho seguimiento debe ser planificado y revisado y puede incluir:

- Uso de materiales de referencia
- Participación en interlaboratorios
- Repetición de un ensayo

Además, el control de calidad interno puede permitir obtener información que indique si métodos son apropiados para el tipo y volumen de trabajo que se realiza de forma cotidiana en el laboratorio.

Los datos debe ser analizados y si no satisfacen los criterios predefinidos se deben tomar acciones planificadas para corregir el problema y evitar los resultados incorrectos. Estos criterios pueden obtenerse a partir de los datos propios de la validación del método así como de los valores reales obtenidos a partir de las pruebas de verificación o validación interna realizados para asegurar la correcta puesta a punto del método en nuestro laboratorio.

2: FACTORES QUE AFECTAN AL CONTROL DE CALIDAD DE LOS ENSAYOS

Como se puede observar en la siguiente figura, son múltiples los factores que afectan a la calidad de los resultados analíticos, estando a su vez relacionados entre sí.

Cada uno de estos factores tiene a su vez diversos puntos que permiten garantizar el adecuado control de los mismos. No obstante, el control de calidad planificado debe realizarse de forma que todos estos factores no se estudien de forma independiente, sino de forma integrada, de modo que puedan evidenciarse interferencias entre los mismos.

Así pues el programa de control de calidad debe asegurar que incluye todo tipo de técnicas y métodos de ensayo que emplee el laboratorio, contemplando de forma particular la diversidad posible en:

- Procedimientos empleados
- Matrices a analizar
- Equipos empleados
- Medios de cultivo y reactivos
- Analistas
- Condiciones ambientales y otros aspectos relacionados.

3: TIPOLOGIAS DE CONTROL DE CALIDAD INTERNO

3.1.- CONTROLES DE 1er NIVEL

Este nivel consiste en una especie de **autocontrol** que pretende evaluar el trabajo diario. Así pues incluye las operaciones de control que realiza el analista durante la ejecución de los ensayos, así como la **supervisión directa** de los resultados por la persona cualificada para ello.

Muchas de estas operaciones se realizan de forma rutinaria sin generar registros, entre las que podemos incluir que puedan ser evaluados, entre los que se pueden citar:

- Control de correcto etiquetado y estado de las muestras
- Verificación del estado del equipo (etiquetas de uso)
- Esterilidad del material y medios de cultivo
- Ajustes y supervisión de equipos (tarado)
- Volúmenes empleados...

3.1.1.- Controles de esterilidad o negativos

Con este control se pretende asegurar la esterilidad de los medios de cultivo empleados y la asepsia de las operaciones de análisis. EN el caso de técnicas de cultivo se realiza mediante la siembra de un volumen de cada uno de los medios de cultivo utilizados, así como del diluyente de la solución madre y de las diluciones seriadas

Se puede realizar con cada serie analítica (es decir muestras que se siembran al mismo tiempo con los mismos medios de cultivo), preferentemente al finalizar la serie de siembras de muestras.

Para su evaluación comprobar que las placas de control de esterilidad no deben presentar crecimiento. En caso de detectar algún tipo de crecimiento deberá valorarse este y evaluar su influencia en el resultado. En caso de que se considere que ha afectado a los resultados, se procederá a invalidar los mismos.

En el caso de medios selectivos y/o diferenciales, puede no ser necesario realizar un control de esterilidad con esta frecuencia dado que generalmente se puede evaluar con cada ensayo así como con el control general de medios de cultivo

Para otro tipo de técnicas instrumentales, el control negativo consiste en procesar una muestra libre del microorganismo a detectar que se analiza de la misma forma que las muestras normales.

3.1.2.- Siembra de duplicados (ensayos cuantitativos)

Se utiliza para tener un control de una posible sobredispersión de los microorganismos o hetereogeneidad en los factores relacionados con el ensayo. En el caso de que el laboratorio realice de forma rutinaria la siembra de placas por duplicado de cada dilución, no supone ningún ensayo suplementario y se puede realizar de forma simultánea en el momento de realizar la lectura de las placas.

Si por el contrario se realiza únicamente una placa por dilución, basta con sembrar una placa más en alguna muestra para su cálculo. En ese caso su frecuencia puede estimarse en función del histórico,

método, variabilidad de las matrices etc... pero se sugiere al menos realizar un duplicado cada 100 recuentos y con una periodicidad semanal.

Se puede realizar mediante , entre otras, dos opciones:

- **Opción 1**: Estudio de dispersión comparando con distribución Poisson

Comparando si la dispersión entre las colonias obtenidas en sendas placas (RSD_{REAL}) es inferior a la dispersión teórica ($RSD_{Teorico}$) estimada según una distribución de Poisson siendo:

$$RSD_{REAL} = \frac{S}{\overline{X}} \quad < \quad RSD_{teorico} = \frac{1}{\sqrt{\overline{X}}}$$

Siendo S: la desviación estándar entre el número de ufc/placa.
X: Valor medio de las colonias de las dos placas.

- **Opción 2:** Comparación con un valor arbitario, evaluando que las diferencias en los recuentos entre ambas placas no supere una límites de ajuste con una probabilidad del 99% por comparación, según la siguiente tabla::

MÁXIMA DE DISPERSIÓN PLACAS DUPLICADAS				
PLACA A	**PLACA B**		**PLACA A**	**PLACA B**
5	16		155	203
10	24		160	209
15	32		165	214
20	39		170	220
25	46		175	226
30	53		180	232
35	59		185	237
40	66		190	243
45	72		195	249
50	78		200	254
55	85		205	260
60	91		210	265
65	97		215	271
70	103		220	277
75	109		225	282
80	115		230	288
85	121		235	294
90	127		240	299
95	133		245	305
100	139		250	310
105	145		255	316
110	151		260	321
115	157		265	327
120	163		270	333
125	168		275	338
130	174		280	344
135	180		285	349
140	186		290	355
145	192		295	360
150	197		300	366

En ambos casos los valores no supondrán necesariamente un criterio de aceptación/rechazo de los resultados sino un valor que debe ser estudiado y evaluado en cada caso.

Parque Tecnológico de Valencia c.Benjamín Franklin 5-11
46980E Paterna Valencia España 961366090 fax 961318008
e-mail info@ainia.es www.ainia.es

3.1.3.- Control del factor de dilución.

Se basa en el control de los volúmenes de dilución, operaciones de manipulación, microorganismos que presentan agregados o problemas de dispersión y/o inhibiciones de la matriz.

- **Opción 1**: Este tipo de controles se puede realizar de forma simultánea en la realización del ensayo y supone la verificación de que los valores obtenidos en dos diluciones decimales consecutivas con número de colonias contables se encuentran dentro de un rango esperado según la siguiente tabla:

Colonias totales dilución 10^{-x}	Colonias totales dilución siguiente ($10^{-(x+1)}$)	
	Limite inferior	Limite superior
10	0	4
15	0	6
20	0	7
25	0	8
30	0	8
35	1	9
40	1	10
45	1	11
50	1	12
55	1	13
60	1	13
65	2	14
70	2	15
75	2	16
80	2	16
85	3	17
90	3	18
95	3	19
100	3	19
105	4	20
110	4	21
115	4	21
120	5	22
125	5	23
130	5	24
135	5	24
140	6	25
145	6	26
150	6	26
155	7	27

Colonias totales dilución 10^{-x}	Colonias totales dilución siguiente ($10^{-(x+1)}$)	
	Limite inferior	Limite superior
155	7	27
160	7	28
165	7	28
170	8	29
175	8	30
180	8	30
185	9	31
190	9	32
195	9	32
200	10	33
205	10	34
210	10	34
215	11	35
220	11	35
225	12	36
230	12	37
235	12	37
240	13	38
245	13	39
250	13	39
255	13	40
260	14	41
265	14	41
270	15	42
275	15	42
280	16	43
285	16	44
290	16	44
295	17	45
300	17	46

- **Opción 2**: Tomar muestras aleatoriamente y bien cuando se sospeche sobredispersión y realizar un estudio de factor de dispersión (D^2) y aceptar si dicho valor es inferior a 2,6, calculado según la siguiente fórmula:

$$D^2 = \frac{(C_1 - 10C_2)^2}{10(C_1 + C_2)}$$

Siendo:
C1 suma de las colonias desarrolladas en las placas de una dilución
C2 suma de las colonias desarrolladas en las placas de la dilución siguiente a C1

3.1.4.- Controles endógenos (métodos basados en PCR)

En las reacciones de PCR se puede emplear un control interno de amplificación que consiste en un ADN añadido a una concentración de copias definido a cada reacción que debe dar una señal de amplificado (interno o externo). Si hemos caracterizado el valor de Ct o bien el tamaño de banda en el que se debe detectar este fragmento, podemos evaluar si han existido inhibiciones de la reacción de PCR a través de su control.

En el caso de la realización de análisis mediante PCR a Tiempo Real la diferencia entre el valor de Ct de un control negativo (blanco sin muestra) y el de la muestra objeto de análisis suele ser inferior a 1, debiendo descartarse el resultado obtenido si esta diferencia es superior a 3 o bien se obtiene un valor muy elevado (superior a 30)

3.2.- CONTROLES DE 2º NIVEL

Dichos controles de realizarán de forma periódica y serán supervisados y preparados por una persona independiente de los analistas que participen en los ensayos.

El objeto de dichas pruebas es garantizar la reproducibilidad entre los diversos analistas, equipos y condiciones de ensayo, así como la influencia de las matrices y flora natural presente en las muestras que habitualmente analiza el laboratorio.

Los controles de segundo nivel consisten básicamente en la realización de ensayos intralaboratorio (que a su vez pueden formar parte de un interlaboratorio, si bien en este caso debe tenerse en cuenta especialmente si se incluye en efecto matriz). Su frecuencia y el personal implicado debe ser previamente definido así como el modo de evaluación del mismo vendrá definido en el plan de evaluación de la calidad que se elabora periódicamente.

Puede estar constituido por muestras ciegas (los analistas conocen que se trata de un ensayo de control de calidad pero desconocen el valor diana) o por doble ciegas (además se desconoce que se trata de un ensayo de evaluación de calidad)

3.2.1.- Frecuencia:

Depende de múltiples factores relacionados entre si, aunque se puede establecer en función del número de ensayos anuales que se ejecuten.

Generalmente la frecuencia varía en función del número de muestras que se analicen (ejm.: 1% de las mismas) o bien por un criterio temporal (ejm. Control mensual en aquellos ensayos que no se realicen frecuentemente)

En el caso de ensayos que se ejecutan con baja frecuencia, debe/puede realizarse el control de calidad de forma simultánea a la realización de los mismos.

3.2.2.-Criterios:

Deben ser coherentes con los resultados obtenidos en la validación/verificación del método.

En el caso de empleo de gráficos de control, basado en criterios de desviación del valor de referencia.

3.2.3.- Tipo de control:

Métodos cuantitativos:

Deben asegurar que la precisión y la exactitud del método están bajo control, así como es interesante estudiar tendencias de los mismos. Para ello pueden emplearse gráficos de control

Para realizarlo es necesario disponer de al menos 20 valores (obtenidos en condiciones de reproducibilidad) de los que se disponga de un valor de referencia (que pueden proceder de los ensayos realizados para la validación interna de la técnica).

A partir de los mismos se calculan los valores logarítmicos del recuento (log ufc/g), y se estima la diferencia entre el valor obtenido y el valor de referencia de cada análisis (d_i), así como la desviación estándar de la reproducibilidad (RSD) de todos ellos:

$$RSD = \frac{S}{\overline{X}}$$

Los límites de control se pueden fijar:

Control de la exactitud a partir del valor medio de las diferencias ($\overline{d}$) siendo el límite inferior ($LCI_e = 0$) y el superior ($LCS_e = 3{,}268\overline{d}$)

Para establecer los límites de precisión, se estima el valor medio de la desviación estándar de la reproducibilidad ($\overline{RSD}$) así como el límite de control superior ($LCS_p = \overline{RSD} + 1{,}880\overline{RSD}$) y el inferior como ($LCI_p = \overline{RSD} - 1{,}880\overline{RSD}$)

Periódicamente se procede a analizar por duplicado matrices reales de las que habitualmente utiliza el laboratorio en las que se ha introducido una concentración conocida de microorganismos diana. A partir de estos valores se calcula la diferencia entre estos y el valor de referencia asi como la RSD de los duplicados y se representa en el gráfico anteriormente descrito.

Podemos considerar que existe tendencia a que la ejecución de los ensayos esté fuera de control si:

- 1 valor sale de los límite establecidos.
- 7 valores consecutivos en la misma parte del gráfico
- Existe tendencias ascendentes o descendentes.

Si más de 2/3 de los puntos están en el tercio central implica que debo recalcular los límites.

Métodos cualitativos:

Estimar la eficacia (coincidencia con el valor diana a un nivel determinado siendo el valor diana para muestras positivas entre el LD y 10xLD)

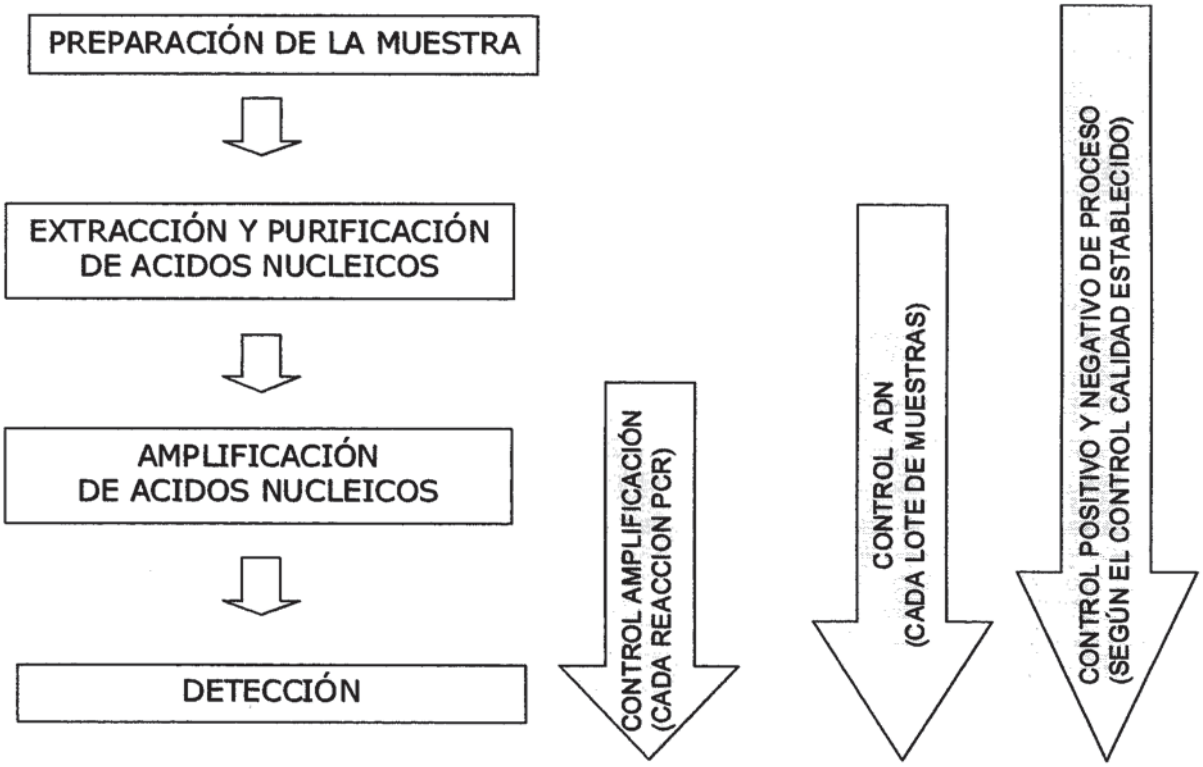
3.2.4.- Controles de métodos moleculares:

Además de los controles de primer nivel contemplados (control de amplificación) se deben establecer otros controles que garanticen la validez de los resultados. Estos controles pueden resumirse en los siguientes:

Control	Objetivo
Control positivo de proceso	Permite asegurar que se detectan bajos niveles de células diana contemplando todas las fases del análisis (crecimiento en la fase de pre-enriquecimiento, extracción de ADN, amplificación y detección)
Control negativo de proceso	Garantiza la ausencia de contaminaciones cruzadas durante toda la manipulación de las muestras
Control positivo de extracción	Permite evaluar eficiencia en la extracción de ADN y posterior amplificación y detección del mismo
Control endógeno	Se encuentra en el mismo tubo donde se está analizando la muestra y permite detectar inhibición y pérdida de eficiencia de la reacción de PCR
Control negativo de PCR (NTC)	Permite detectar contaminaciones cruzadas entre muestras de la misma tanda durante el proceso de amplificación y detección de ADN
Referencia pasiva ROX	Permite normalizar todas las señales de fluorescencia de forma que se pueda comparar los resultados de las muestras y de los controles internos para evaluar sus resultados de forma cuantitativa.
Reactivo UNG-Gly	Consiste en un enzima presente en la mezcla de reactivos que permite hidrolizar cualquier fragmento de ADN procedente de anteriores análisis, evitando la posibilidad de contaminación cruzada en la reacción de amplificación y detección.

Parque Tecnológico de Valencia c.Benjamín Franklin 5-11
46980E Paterna Valencia España 961366090 fax 961318008
e-mail info@ainia.es www.ainia.es

La evaluación de resultados de las muestras analizadas se basa en la validez de estos controles, según se indica en la siguiente tabla:

Muestra	Control endógeno	Control positivo proceso	Control positivo extracción	Control negativo	Interpretación resultados
+	+/-	+/-	+/-	-	Positivo
-	+	+	+	-	Negativa
+	+/-	+	+	+	Contaminación
-	-	+/-	+/-	+/-	Inhibición PCR

Así pues, los controles de calidad internos y las fases que cubren pueden verse esquematizados en la siguiente figura: