

Control de calidad en el laboratorio de andrología

Dr José Antonio Castilla

Unidad de Reproducción. HU "Virgen delas Nieves". Granada

Se entiende por control de calidad en el Laboratorio Clínico el conjunto de procesos que aseguran la fiabilidad técnica de las determinaciones que se realizan. Garantía de calidad es el conjunto de procedimientos utilizados para asegurar la calidad de los resultados finales, cubriendo para ello todas las fases del proceso analítico (preanalítica, analítica y postanalítica). La garantía de calidad es un concepto más amplio que el de control de calidad dado que mientras éste se concentra exclusivamente en asegurar la calidad del proceso analítico, la garantía de calidad contempla de modo integral toda la actividad que lleva a cabo el laboratorio clínico.

La fase preanalítica incluye los siguientes procesos: preparación de paciente, procedimientos para recogida, transporte, conservación y preparación de la muestra. La fase analítica incluye: conservación y preparación de reactivos y aparatos, selección y uso de materiales de control y procesos estadísticos de decisión para validación de resultados obtenidos (control de calidad). Y por último, la fase postanalítica incluye los siguientes procesos: revisión de la congruencia de los resultados obtenidos, preparación y archivo de informes, conservación de muestras después de su análisis, etc.

En este tema nos centraremos en las bases del control de calidad en el laboratorio de Andrología, el cual pretende detectar y minimizar los errores de medida. El error de cualquier medida tiene dos componentes: aleatorio y sistemático. El error aleatorio hace referencia a la dispersión que se obtiene al medir un mismo parámetro varias veces en la misma muestra, en su ausencia se habla de precisión, y se suele expresar en desviación estándar o coeficiente de variación (porcentaje de desviación respecto al valor medio: desviación estándar x 100/media). El error sistemático hace referencia al error de localización, es decir, la diferencia entre el valor real y la media

obtenida tras la realización de varias determinaciones, en su ausencia se habla de veracidad o exactitud, y se expresa en unidades o porcentaje respecto al valor verdadero.

Por otra parte, y antes de entrar a la aplicación de estas ideas en el laboratorio de andrología comentemos que dentro del laboratorio de andrología se realizan determinaciones analíticas de varios especímenes (semen, suero, fluido prostático). Los procedimientos de control de calidad de las determinaciones hormonales están muy extendidos debido a la automatización de estas determinaciones. Donde se están realizando actualmente más esfuerzos es en la implantación de programas de control de calidad en el análisis de semen, de aquí que la OMS en su último manual de análisis se dedique un 15% de su contenido a este tema. Por esto nos centraremos en este último punto del laboratorio de andrología.

Mediante una aproximación simplista pero didáctica al tema de control de calidad podemos decir que el estudio del error aleatorio (precisión) se realiza mediante las técnicas de control de calidad interno, y del error sistemático (exactitud) mediante el control de calidad externo, ya que tomamos como valor real la media de todos los laboratorios participantes en el programa de control de calidad externo. Posteriormente veremos que las cosas no son tan simples.

CONTROL DE CALIDAD INTERNO

La distribución aleatoria de los espermatozoides, incluso cuando la muestra está muy bien mezclada, es en gran parte responsable de falta de precisión en los resultados del análisis del semen. La medición de concentración, movilidad y morfología se realiza con un limitado número de espermatozoides que suponemos representativos de toda la muestra, lo cual pro-

voca un error aleatorio que se denomina “error de conteo”. La magnitud de este error está inversamente relacionada con la raíz cuadrada del número de espermatozoides contados. Teniendo en cuenta que el error de conteo puede ser reducido examinando un mayor número de espermatozoides, debe también evaluarse la posible pérdida de exactitud debida al cansancio del técnico que realiza la medición por lo que es necesario establecer un equilibrio entre ambos factores.

Además del error de conteo, se producen otros errores adicionales que pueden provenir de una inadecuada homogenización de la muestra, estrés del técnico, material en condiciones no idóneas... Por el contrario, si la variabilidad encontrada es inferior a la esperada por el error de conteo, se plantea la posibilidad de errores de recogida de datos o sesgos inducidos por el conocimiento de anteriores resultados.

El control de calidad interno se establece precisamente para evitar al máximo la imprecisión, dependerá de la carga de trabajo y de la experiencia de los técnicos. Se recomienda que entre el 1% y 5% de las muestras trabajadas correspondan a control de calidad, éste se establece a distintos niveles (Mar, 1999):

a) A nivel intra-individual es deseable que todas las mediciones que realiza un observador se hagan por duplicado y, si las diferencias superan el error de conteo, se rechace la medición comenzándose de nuevo. Es necesario que la medición duplicada se realice desde el comienzo del procedimiento, si lo limitamos a la lectura al microscopio no podremos detectar errores de preparación

b) A nivel de observador, cuando entra a formar parte de un equipo de trabajo, deberá ser instruido y realizará mediciones en paralelo hasta conseguir que no existan desviaciones sistemáticas. Mortimer (1994) propone realizar series de 30 mediciones y hacer un seguimiento mediante gráficas que muestran para cada serie la media de las diferencias con un observador experimentado y su desviación estándar. Una vez asegurada la intercambiabilidad de resultados, se recomienda realizar semanalmente un programa de control intertécnicos, con muestras de pacientes o con muestras control.

c) Un tercer nivel de control de calidad debe ser establecido una vez que el paso anterior ha sido superado. Como en todos los ámbitos del laboratorio clínico, debe realizarse un seguimiento continuo de los resultados que se ofrecen mediante el procesamiento de especímenes conocidos. Este tipo de control es el que responde al concepto clásico de control de calidad interno en un laboratorio, pudiendo realizarse con materiales de control o con muestras de los pacientes.

Para el control de calidad de la concentración es-

permática los materiales de control pueden ser semen congelado, suspensión de espermatozoides en formol en vial único o alícuotas de esa suspensión. Se obtienen menores coeficientes de variación cuando se utilizan suspensiones de espermatozoides en un solo vial, ya que evitamos el error que se comete al hacer las alícuotas (Mar, 2001). A partir de esa suspensión se necesita un mínimo de 10 datos obtenidos en series o días diferentes para determinar la media y la desviación estándar (DS) de la concentración de espermatozoides en esa suspensión. Con estos parámetros se representa un gráfico tipo Levy-Jennings (Xbar) donde el valor objetivo es la media y se calcula el límite de advertencia ((2 DS) o de toma de acción ((3 DS) (Gráfico 1).

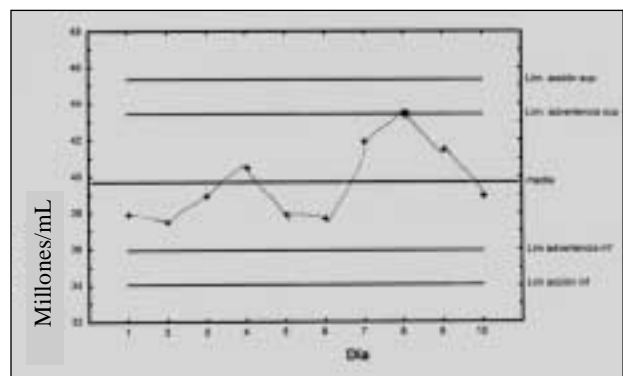


Gráfico 1

Gráfico tipo Levy-Jennings realizado con el resultado de evaluar 10 días una suspensión de espermatozoides en formol conservada en nevera.

Si en una gráfica de ese tipo vamos anotando los resultados de cada control y el procedimiento de medida funciona correctamente, al cabo de un tiempo se observa que dichos resultados oscilan de forma aleatoria alrededor de su media y que en un 95,45% de los casos estos resultados se hallan dentro del intervalo definido por media(2DS y que en un 99,73% de los casos estos resultados se hallan dentro del intervalo definido por media(3DS. Un intervalo de control es un intervalo que contiene, con una probabilidad determinada, los resultados de control cuando el proceso de medida se comporta como está previsto (Fuentes y Panadero, 1998).

A partir de ese gráfico existen reglas de control básicas para vigilar la aparición de errores (Tabla 1). Si no hay problemas los valores de la media y error estándar se recalculan después de la 10 muestras y los límites de control actualizados. Antes de que las

Tabla 1
Reglas básicas de control para gráficos tipo Levy-Jennings

Regla de control Un resultado fuera de límites Dos resultados consecutivos ambos por encima del límite advertencia superior o ambos por debajo del límite advertencia inferior	Tipo de error Aleatorio o sistemático Sistemático
Dos resultados consecutivos uno por encima del límite superior de advertencia y otro por debajo del límite de advertencia inferior	Aleatorio
Ocho resultados consecutivos todos por encima o por debajo de la media	Sistemático

muestras del control de calidad se acaben, se debe preparar una nueva partida y se deben analizar 10 muestras de la nueva partida junto con las muestras restantes de la antigua partida para establecer los nuevos límites de control. Con este tipo de grafica detectaremos cambios respecto a un valor objetivo (la media) o un incremento general de la variabilidad.

Si en el laboratorio trabajan varios profesionales cada día evaluarán el material de control todos los técnicos, obteniéndose una media y una DS con los datos de un día, con la media y la desviación estándar de esas medias diarias y una serie de factores de corrección podemos construir un gráfico como el descrito anteriormente (gráfico Xbar), y por otra parte, con la media de las DS diarias se construye un gráfico similar pero denominado Sbar, donde el valor objetivo es la media de las DS obtenidas, y los límites control se obtienen utilizando el error estándar de la media de la DS, siendo n el número técnicos. Este gráfico Sbar es muy útil para determinar si los técnicos están produciendo resultados discrepantes o si están sobre o subestimando sistemáticamente.

Para el control de calidad de la movilidad y morfología espermática con materiales de control se puede utilizar semen congelado o cintas de vídeo en el primer caso y muchas extensiones de una misma muestra, en el segundo.

A parte de las técnicas descritas (Gráfico tipo Levy-Jennings, Sbar) otros métodos para control de calidad con materiales de control son curvas de potencia, algoritmos individuales, método de sumas acumuladas, media móvil, etc.

A partir de las muestras de pacientes se pueden realizar otras técnicas de control de calidad interno. La primera posibilidad es un sistema basado en calcular y dibujar un gráfico tipo Levy-Jennings con la media mensual (o bimensual en función del número de

muestras analizadas) y su desviación estándar, de tal modo que cuando los resultados a estudiar caen fuera de dos desviaciones estándar se investigue las causas que lo originan (Clarke, 1997). Este sistema es válido para el seguimiento de todos los parámetros seminales. También se puede tomar una muestra al día y analizarla diferentes técnicos y construir un gráfico Sbar como hemos expuesto anteriormente. En este caso no tiene sentido construir un gráfico Xbar, donde el valor objetivo es la media, por que cada día se realiza con una muestra de paciente diferente. A partir de estos datos se puede también evaluar la variación entre técnicos mediante la aplicación de análisis de la varianza de dos factores (muestras y técnicos). Otros métodos de control de calidad a aplicar a muestras de pacientes son los algoritmos de Bull o los duplicados interseriales.

Recientemente se ha desarrollado un nuevo tipo de control de calidad interno gracias a la generalización de la informática consiste en la comparación de un valor de un paciente con los resultados obtenidos en análisis anteriores en ese mismo paciente, este sistema se denomina "delta checks" y es útil para detectar errores de confusión de nombres o de resultados.

Un esquema de control que propone la OMS es el siguiente:

1. Diario: Supervisión y correlación de los resultados para una misma muestra (ensayo por duplicado).
2. Semanal: Análisis de medidas duplicadas por diferentes técnicos para los principales parámetros seminales.
3. Mensual: Análisis de la media de los resultados de cada test.
4. Cuatrimestral. Participación en programas de control de calidad externo y calibración de las pipetas.
5. Anual: Calibración de las cámaras de conteo y otro tipo de material.

CONTROL DE CALIDAD EXTERNO

Tras la aparición del manual de estandarización de técnicas de análisis de semen de la OMS (1992), donde se recomendaba "la comparación de datos entre diferentes laboratorios y la sumatoria de resultados de diferentes fuentes para su análisis", es decir el inicio de programas de control de calidad externo (CCE) e interno en los laboratorios de Andrología, diferentes países (Alemania, Inglaterra, Francia, Holanda, España y Bélgica) iniciaron proyectos de control de calidad externo para laboratorios de andrología.

El manual de la OMS de 1999 de análisis de semen hace diferentes apuntes sobre dichos programas. Se recomienda que los programas de CCE e interna se complementen. Que las muestras de CCE se analicen de la misma manera que si fueran muestras de rutina, por lo que métodos o técnicas de rutina que no puedan aplicarse a los materiales de CCE no deben ser utilizados, ya que un método analítico que no puede ser evaluado difícilmente alcanzará niveles adecuados de precisión. En este sentido y dado que la mayoría de programas de CCE europeo utilizan para la evaluación de la movilidad cintas de vídeo, se recomienda por el Comité de Control de Calidad del Grupo de Interés Especial en Andrología de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE) que el personal técnico del laboratorio de Andrología se acostumbre a la evaluación rutinaria de la movilidad a través de monitores de vídeo.

La manera de participar en los programas de CCE según la OMS (1999) es mediante un miembro del personal de laboratorio que tenga un aceptable nivel en el programa de control de calidad interno. Dicha persona será la encargada de analizar el material del programa de CCE y sus resultados serán los remitidos por el laboratorio.

Las muestras empleadas en los programas de CCE deberán abarcar todo el rango clínico de los parámetros seminales. En caso de utilizarse pocas muestras en el programa de CCE deberán utilizarse aquellas que tengan parámetros próximos a niveles de decisión clínica (en concentración entre 3-30 mill/ml, en movilidad entre 10-40% de espermatozoides móviles, y en morfología menos del 20% de formas normales). Dicho material debe proceder de varones seronegativos para HIV y hepatitis.

El material a analizar puede ser para concentración: semen congelado, suspensión de espermatozoides fijados con formalina, suspensión de partículas de latex o vídeo. Para la movilidad puede utilizarse vídeo o semen congelado. Para la morfología semen

congelado, portas fijados sin teñir o portas con semen fijado y teñidos, vídeos y fotos. Para la evaluación de la vitalidad puede utilizarse portas teñidos o vídeos y semen congelado. Para la evaluación del test hiposmótico semen congelado o vídeos. Para la evaluación de técnicas de recuperación de espermatozoides móviles semen congelado. Y por último para la evaluación de la determinación de anticuerpos antiespermatozoide (AAE) semen con AAE+ congelado si es MAR test directo o sueros si es MAR test indirecto. El envío del material para el CCE debe ser según la OMS (1999) cuatrimestral.

Todo el material comentado anteriormente tiene ventajas e inconvenientes. Así, la evaluación de movilidad por cintas de vídeo tiende a dar unos resultados muy optimistas sobre la imprecisión, que puede hacer que muchos laboratorios consideren innecesario dos lecturas de la movilidad. El semen congelado puede presentar problemas a la hora de la homogeneización y los portas teñidos tienden a decolorarse y los fijados a deteriorarse. Por esto el material debe analizarse lo antes posible desde la recepción.

En España tras una experiencia piloto con 18 laboratorios, se instauró en 1999 el primer programa de control de calidad externo auspiciado por ASEBIR dicho programa esta coordinado con el Comité de Control de Calidad del Grupo de Interés Especial en Andrología de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología (ESHRE). En dicho programa participan actualmente 43 laboratorios. Siendo un programa de CCE tipo I, es decir, consiste en analizar alícuotas de una misma muestra en diferentes laboratorios dos veces al año. El procesamiento de los resultados se realiza de forma anónima, introduciendo los datos por duplicado con verificación de los mismos en la aplicación informática encargada de su análisis estadístico. Todos los resultados se analizan por técnica y método utilizado, calculándose media, desviación estandar, coeficiente de variación, máximo, mínimo y rango intercuartílico. Se descartan todos los valores que sean (3DS).

Los resultados del programa de CCE en España arrojan los siguientes datos. La concentración espermática presenta un coeficiente de variación (CV) de un 40% si se utiliza semen congelado, de un 31% si se utiliza suspensiones con bolitas de latex o espermatozoides y de un 25% si se utilizan cintas de vídeo. No se observa relación entre CV obtenidos y concentración de espermatozoides a analizar. En cuanto a movilidad progresiva los CV obtenidos son con semen congelado más altos que con cintas de vídeo (35% vs 18%), siendo mayores cuanto menos espermatozoides móviles progresivos hay en la muestra. Los CV del

porcentaje de espermatozoides móviles tipo "a" (rápidos, lineales y progresivos) son más elevados (60%) que el de espermatozoides móviles progresivos totales (25%), ya sea en vídeo o semen congelado.

Respecto a la morfología espermática el CV de espermatozoides normales obtenido mediante la evaluación de vídeo es más bajo (28%) que el observado en portas teñidos (45%), sin teñir (52%) o semen congelado (51%). El uso de criterios estrictos o de la OMS (92) no influye en los CV obtenidos, lo que si parece influir es el porcentaje de espermatozoides normales presentes en la muestra, que cuanto menor es mayor es el CV obtenido.

Si comparamos los coeficientes de variación obtenidos con los descritos por otros programas nacionales de control de calidad externo observamos que son casi superponibles. Así, los coeficientes de variación de la determinación de concentración informados por Neuwinger et al. (1990) oscilaron entre 23%-41%, Matson et al. (1995) entre 5%-40%, Carrell et al. (1996) entre 7%-41% y Keel et al. (2000) entre 24-138%. En cuanto a la determinación de la movilidad observamos que nuestros coeficientes de variación son superiores a los informados por el grupo alemán (Neuwinger et al., 1990) y superponibles a los de Carrell et al. (1996) que encuentran unos coeficientes de variación entre 8%-60%.

Donde podemos observar una mayor discrepancia en los resultados obtenidos con los de otros programas es en la evaluación de la morfología independientemente de los criterios utilizados, ya que Neuwinger et al. (1990) obtienen entre 25%-26% y Carrell et al. (1996) entre 7-41%, no obstante nuestros valores son superponibles a los referidos por otros autores entre 25%-70% (Matson et al., 1995) y 15-93% (Keel et al., 2000).

Al analizar la evolución de algunos CV entrelaboratorios en los 6 envíos realizados podemos observar como estos no han variado a lo largo del tiempo, esto puede ser debido a la ausencia de una evaluación de los resultados en los laboratorios participantes, ya que diferentes autores han demostrado la utilidad de esta evaluación (retroalimentación) consiguiendo mejorar considerablemente su exactitud, no obstante estos autores han conseguido esta mejoría tras una participación más larga en programas de CCE (16 envíos) (Cooper et al., 1999).

En resumen, para un aceptable nivel de calidad es necesaria la comparación de resultados obtenidos mediante métodos de análisis similares, por lo que es fundamental utilizar métodos estándar como el propuesto por la OMS (WHO, 1999), a parte de esto y

como hemos comentado parece fundamental participar en programas de control de calidad interno y externo, y por último, consideramos fundamental la participación en programas de educación continuada y foros de discusión para que el personal que realiza el análisis de semen esté bien formado y utilice los mismos criterios. En este último sentido cabe destacar experiencias realizadas en España de cómo se reducía la variabilidad entre personal de diferentes laboratorios tras la participación en curso de formación en análisis de semen (Mar, 1999).

BIBLIOGRAFÍA

1. **Clarke GN.:** A simple monthly means chart system for monitoring sperm concentration. *Hum Reprod*, 1997;12:2710-2712.
2. **Cooper TG, Atkinson AD, Nieschlag E.:** Experience with external quality control in spermatology. *Hum Reprod*, 1999, 14:765-769.
3. **Cooper TG, Neuwinger J, Bahrs S, Nieschlag E.:** Internal quality control of semen analysis. *Fertil Steril*, 1992, 58:172-178
4. **Carrell DT, Cornwell CE, Thorp C, Cartmill DC, Urry RI.:** Evaluation of a five year intra and interlaboratory semen analysis quality control program. *ASRM Annual meetings*, 1996.
5. **Fuentes X, Panadero MT.:** Control interno de la calidad. En *Bioquímica clínica y patología molecular*. Eds. Fuentes X, Castiñeiras MJ, Queraltó JM. Barcelona: Editorial Reverté, 1998, 515-525.
6. **Keel BA, Quinn P, Schmidt CF et al.:** Results of the American of Bioanalysts national proficiency testing programme in andrology. *Hum Reprod*, 2000;15:680-686.
7. **Mar C.:** Garantía de calidad en el laboratorio de andrología. En: *Temas de actualidad de andrología I*. Madrid:ASESA, 1999.
8. **Mar C.:** ¿Qué han aportado los criterios OMS-99 en el análisis de semen?. EN *Temas de actualidad en andrología*. Eds: Marín JC, Astobieta A, Castilla JA, Martín A, Moncada I, Segura A. Madrid:ASESA, 2001.
9. **Matson PL.:** External quality assessment for semen analysis and sperm antibody detection: results of a pilot scheme. *Human Reprod*, 1995;10:620-625
10. **Mortimer D.:** Laboratory standards in routine clinical andrology. *Rep Med Rev*, 1994, 3:97-111
11. **Neuwinger J, Behre HM, Nieschlag E.:** External quality control in the andrology laboratory: an experimental multicenter trial. *Fertil Steril*, 1990, 54:308-314
12. **WHO:** Laboratory Manual of Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction. Cambridge University Press: Cambridge, 1999.