

Libros de **Cátedra**

Pesquisa neonatal

Gustavo JC Borrajo

FACULTAD DE
CIENCIAS EXACTAS

e
exactas


EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA

PESQUISA NEONATAL

Gustavo JC Borrajo

Facultad de Ciencias Exactas



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA


EDITORIAL DE LA UNLP

La presente obra está basada en la Tesis Doctoral del autor titulada "Pesquisa Neonatal de Enfermedades Congénitas", 2011.

Índice

Capítulo 1	
Pesquisa Neonatal _____	5
Capítulo 2	
Organización de un Programa de Pesquisa Neonatal _____	20
Capítulo 3	
Organización de un Laboratorio de Pesquisa Neonatal _____	31
Capítulo 4	
Automatización _____	63
Capítulo 5	
Validación de Métodos _____	69
Capítulo 6	
Calidad en Pesquisa Neonatal _____	79
Capítulo 7	
Sistema Integral de Control de Calidad _____	94
El autor _____	103

CAPÍTULO 1

Pesquisa Neonatal

Pesquisa Neonatal de Enfermedades Congénitas

Definición y Objetivos

La Pesquisa Neonatal de Enfermedades Congénitas, conocida también como *screening*, tamiz, tamizaje, cribado, *triagem* o *dépistage* neonatal, puede ser definida como un sistema preventivo de la Salud Pública diseñado para llevar a cabo la detección masiva y universal y el posterior tratamiento precoz de un grupo seleccionado de enfermedades congénitas que se caracterizan por la ausencia de síntomas en el período neonatal, pero que en ausencia de diagnóstico y tratamiento precoz resultan ser potencialmente catastróficas para los individuos afectados, pudiendo causar principalmente daño neurológico severo e irreversible, afectación discapacitante de múltiples órganos y tejidos, o inclusive -en algunas de ellas- la muerte del recién nacido durante los primeros días de vida (1-3).

La ausencia de manifestaciones clínicas durante el período neonatal impide que el médico pediatra o neonatólogo que asiste al recién nacido pueda establecer un diagnóstico basado en la clínica, razón por la cual para poder realizar una detección precoz se debe recurrir a la determinación de marcadores bioquímicos, moleculares o funcionales que ya se encuentran alterados durante los primeros días de vida antes de que el cuadro clínico de la enfermedad haya comenzado a expresarse, haciendo posible así el diagnóstico precoz y la implementación de un tratamiento apropiado en forma oportuna que evitará la instalación del cuadro clínico.

De este modo, el objetivo de la Pesquisa Neonatal consiste en identificar y tratar un grupo de enfermedades congénitas seleccionadas a efectos de reducir o eliminar la morbilidad, mortalidad y/o discapacidad asociadas con los desórdenes investigados (3), razón por la cual la misma ha sido reconocida recientemente por el *Centers for Disease Control and Prevention* - CDC de los EE.UU. como uno de los diez logros más importantes alcanzados por la Salud Pública (4).

En la actualidad los marcadores disponibles para la realización de las pruebas de pesquisa están representados en un 90-95 % por parámetros bioquímicos, mientras que en el 5-10 % restante por marcadores moleculares o funcionales, debiendo destacarse que en el caso de las

pruebas de pesquisa basadas en la determinación de parámetros bioquímicos y moleculares se requiere la recolección de una muestra de sangre entera impregnada en papel de filtro obtenida por punción del talón del recién nacido, mientras en el caso de las pruebas basadas en la determinación de parámetros funcionales se requiere la valoración de cada neonato en la propia maternidad antes de que el niño sea dado de alta, empleando para ello equipamiento específico acorde al tipo de patología pesquisada (5-7).

Dentro de este contexto, y dada la preponderancia de enfermedades que se detectan a través de la determinación de marcadores bioquímicos y moleculares, el laboratorio de pesquisa desempeña un rol fundamental puesto que es el responsable de tamizar a toda la población de recién nacidos aparentemente sanos a efectos de separar a los neonatos normales de aquellos potencialmente afectados (8). No obstante, debe quedar absolutamente en claro que la Pesquisa Neonatal no se trata de un evento único consistente en efectuar la recolección de una muestra de sangre del talón del recién nacido y en realizar una prueba de laboratorio en forma aislada, sino que por el contrario las acciones de la Pesquisa Neonatal forman parte de un proceso (9) que incluye educación, pesquisa, acciones de localización, diagnóstico, tratamiento y seguimiento y evaluación (3, 9-10) y que, para alcanzar el objetivo preventivo de manera exitosa se requiere del esfuerzo cooperativo de todos los efectores involucrados los cuales incluyen las familias de los niños, los responsables de la recolección de muestras y del transporte de las mismas, los integrantes de los equipos de laboratorio de pesquisa y confirmación, los responsables de las acciones de localización, los integrantes de los equipos de atención médica especializada y seguimiento, y los responsables políticos que intervendrán en la toma de decisiones, grupo dentro del cual generalmente se incluye también a los financiadores (9).

En consonancia con dichos conceptos también resulta imprescindible dejar en claro que un resultado anormal en una prueba de pesquisa no es equivalente a diagnóstico (2,8,11). Por el contrario, la Pesquisa Neonatal no tiene por objetivo implementar acciones terapéuticas sobre la simple base de un resultado positivo en una prueba de pesquisa (12), sino que por el contrario, todo recién nacido con un resultado anormal deberá ser sometido a una secuencia de acciones diagnósticas en concordancia con los algoritmos de trabajo establecidos en cada programa, a través de las cuales será posible confirmar o descartar la patología (2,8).

Organización, estructura y componentes

En virtud de lo antes expuesto, y con la finalidad de garantizar el éxito terapéutico y preventivo de la Pesquisa Neonatal, la misma debe ejecutarse bajo la forma de programas organizados, geográficamente regionalizados y funcionalmente centralizados (2,13,14). Esto significa que las distintas actividades del sistema de Pesquisa Neonatal deberán estar perfectamente definidas, planificadas y sistematizadas como parte de un Programa de Atención Preventivo, el cual presentará un alcance regional -ya sea un país, una provincia o bien un conjunto de provincias o ciudades-, es decir que el programa de pesquisa prestará servicio para una región o

jurisdicción particular (10), que funcionará en forma centralizada en la mayor parte de las actividades específicas que conforman la estructura del programa, y cuyos límites de acción quedarán definidos en base al número anual de recién nacidos de dicha región, a la superficie que comprenda la misma¹, a sus características geográficas¹, al grado de urbanización¹; a las políticas de salud vigentes, y al presupuesto con que se cuente para su ejecución.

La mencionada modalidad de implementación centralizada y regionalizada de las actividades de la Pesquisa Neonatal no resulta de una decisión no fundamentada sino que por el contrario se sustenta en principios de eficiencia y economía, puesto que a través de la misma resultará posible alcanzar una adecuada optimización y aprovechamiento de los recursos humanos y económicos; una significativa reducción en los costos, un incremento en la eficiencia, rendimiento, y confiabilidad, y la estandarización de las diferentes tareas que conforman el proceso de pesquisa (2,14).

En lo que respecta a la estructura del Programa, la misma debe establecerse sobre la base de los seis componentes esenciales de la Pesquisa Neonatal, es decir educación, pesquisa, acciones de localización, diagnóstico, tratamiento y seguimiento, y evaluación (3), y su planificación debe ser tal que permita lograr una integración coordinada y dinámica entre sus distintos niveles de ejecución, con lo cual será posible asegurar que sus tareas sean ejecutadas en forma responsable, oportuna y apropiada, y por parte de efectores específicos.

Dichos niveles de ejecución corresponden a cada una de las tareas específicas del programa de Pesquisa Neonatal y pueden ser definidos como las unidades funcionales de los componentes antes mencionados, de modo que los mismos pueden ser representados como los eslabones de una cadena o secuencia de acciones (2,13-15). (Figura 1).

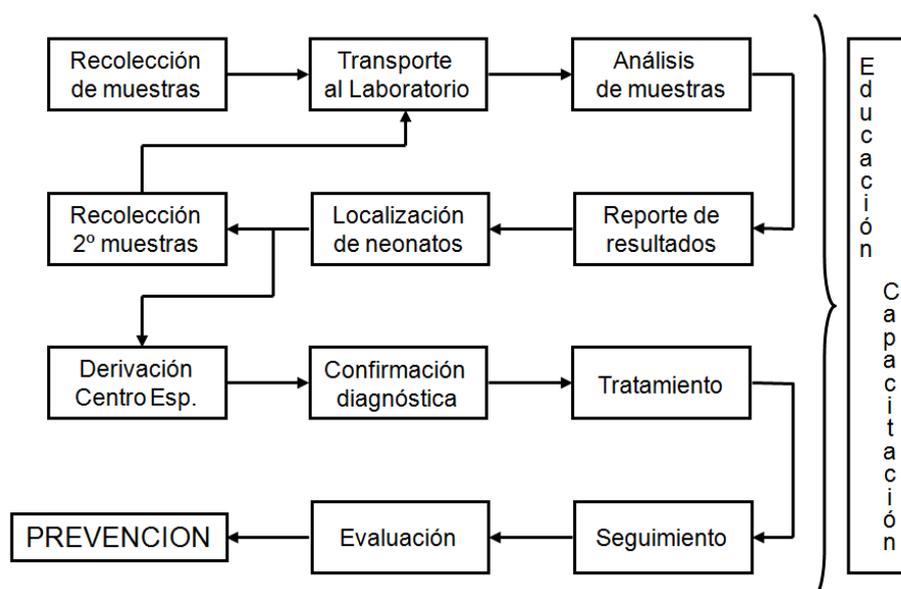


Figura 1. Niveles de ejecución de la Pesquisa Neonatal

¹ La superficie, características geográficas y el grado de urbanización ejercen una influencia directa sobre la logística, transporte de muestras, comunicaciones y acciones de localización y derivación del programa de Pesquisa Neonatal.

Por último, se debe mencionar que por definición la Pesquisa Neonatal forma parte de la Atención Primaria de la Salud Pública (2) y por lo tanto el acceso a este tipo de sistemas de detección es un derecho de todos los recién nacidos del mismo modo que ocurre, por ejemplo, con otros Programas de Acciones Preventivas como son los planes de inmunización, razón por la cual, es una obligación del Estado asegurar la implementación y el funcionamiento continuo y sistemático de los mismos bajo la forma de programas (2,14).

Origen de la Pesquisa Neonatal

La Pesquisa Neonatal reconoce su origen en los EE.UU. a comienzos de la década del '60, cuando Robert Guthrie materializó su genial idea de recolectar las muestras de sangre de recién nacidos en tarjetas de papel de filtro y puso en práctica el método de inhibición bacteriana que él mismo desarrollara (16) para la detección neonatal de Fenilcetonuria, empleando muestras de sangre seca. Estos avances introducidos por Robert Guthrie no solo permitieron abrir una puerta de acceso al diagnóstico precoz, sino que también introdujeron una posibilidad inédita de prevenir el daño neurológico causado por la enfermedad, puesto que algunos años antes, Hoerst Bickel en Birmingham, había demostrado que la implementación precoz de una restricción dietaria de Phe era capaz de atenuar la expresión del cuadro clínico de la enfermedad en individuos no tratados (17,18).

Criterios de selección de enfermedades congénitas a pesquisar

Un aspecto sumamente importante a tomar en consideración en los Programas de Pesquisa Neonatal son los criterios utilizados para la selección de las enfermedades congénitas a pesquisar, puesto que la incorporación de una patología determinada a un Programa siempre debe estar sustentada por una relación costo/beneficio favorable que permita justificar la realización de la misma.

Con esta finalidad, en 1968 Wilson y Jungner establecieron 10 criterios de selección como parte de su obra "Principios y prácticas del *screening* de enfermedades" (19) (Tabla 1), los cuales fueron adoptados por la Organización Mundial de la Salud como criterios de aplicación universal para la Pesquisa Neonatal.

Tabla 1. Criterios de selección de enfermedades de Wilson y Jungner

1. La enfermedad debe ser un importante problema de salud.
2. Debe existir un tratamiento aceptado para pacientes con enfermedad reconocida.
3. Debe disponerse de infraestructura para el diagnóstico y el tratamiento.
4. Debe existir un estadio latente de la enfermedad o estadio sintomático temprano.
5. Deben existir exámenes o pruebas adecuados.
6. Los exámenes o pruebas deben ser aceptables para la población.
7. La historia natural de la enfermedad, incluyendo el desarrollo desde enfermedad latente a declarada, debe ser conocida en forma adecuada.
8. Deben existir políticas definidas acerca de quiénes deben ser tratados como pacientes.
9. Los costos de detección de un caso (incluyendo diagnóstico y tratamiento de pacientes diagnosticados) deben estar económicamente balanceados en relación a los costos de atención médica completa.
10. La detección de casos debe ser un proceso continuo, no solo por una vez.

A partir de dichos criterios y con el transcurrir de los años, se fue experimentando la incorporación progresiva de nuevos desórdenes congénitos al grupo de patologías pesquisables, habiendo alcanzado en la actualidad más de 30 enfermedades que pueden ser agrupadas en dos categorías principales: el Panel Básico y el Panel Ampliado de Pesquisa Neonatal.

Dentro del Panel Básico se incluyen aquellas enfermedades que pueden ser pesquisadas utilizando métodos clásicos de Laboratorio², entre los que se puede citar a los métodos bacteriológicos, químicos, enzimáticos o inmunológicos (RIA-IRMA, EIA, FEIA, DELFIA), y cuya pesquisa está ampliamente difundida a lo largo de todo el mundo desde hace alrededor de 4 décadas o más (Tabla 2) y también un grupo de patologías en las que su búsqueda está indicada dependiendo expresamente de la composición étnica de la población en estudio como por ejemplo en individuos de una etnia particular.

Tabla 2. Panel básico de Pesquisa Neonatal

<ul style="list-style-type: none"> ● Fenilcetonuria. ● Hipotiroidismo Congénito. ● Galactosemia. ● Hiperplasia Suprarrenal Congénita. ● Deficiencia de Biotinidasa. ● Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce. ● Fibrosis Quística.
<ul style="list-style-type: none"> ● Hemoglobinopatías³. ● Deficiencia de Glucosa 6-fosfato-Deshidrogenasa³.

² Métodos clásicos de pesquisa son aquellos en los cuales se analiza una alícuota de una muestra de sangre con un método particular para medir un analito determinado y detectar así una enfermedad.

³ Hemoglobinopatías y Deficiencia de Glucosa-6-fosfato Deshidrogenasa se pesquisan específicamente en poblaciones con un componente significativo de individuos de etnia afro-americana.

Por otra parte, dentro del Panel Ampliado se incluye una gran variedad de enfermedades congénitas cuya incorporación a los Programas de Pesquisa Neonatal se ha producido mucho más recientemente, que requieren la utilización de métodos altamente sofisticados y costosos como la espectrometría de masa en tándem o las técnicas moleculares, o cuya detección se realiza a través de la determinación de medidas funcionales como lo son la medida de otoemisiones acústicas (5,9) o del nivel de saturación de oxígeno mediante un oxímetro de pulso (6,7).

Tabla 3. Panel ampliado de Pesquisa Neonatal

<ul style="list-style-type: none"> ● Aminoacidopatías. ● Acidurias orgánicas. ● Defectos de oxidación de ácidos grasos. ● Defectos de la audición. ● Enfermedad cardíaca congénita crítica (CCHD). ● Inmunodeficiencia combinada severa (SCID). ● Enfermedad de Pompe. ● Mucopolisacaridosis Tipo I (MPS I). ● Adrenoleucodistrofia ligada al X (X-ALD). ● Atrofia Muscular Espinal (SMA).
--

Nuevos criterios de selección de enfermedades a pesquisar

A lo largo de su historia, la Pesquisa Neonatal se ha caracterizado por ser un sistema extraordinariamente dinámico, en el cual en el transcurso de 50 años se evolucionó desde realizar la pesquisa de una enfermedad aislada como la Fenilcetonuria a pesquisar actualmente para más de 30 desórdenes; desde testear a los recién nacidos con tecnologías relativamente simples como los ensayos bacteriológicos de lectura visual a realizarlos con metodologías más complejas que requieren instrumental sofisticado, informatización y personal altamente entrenado como la espectrometría de masa en tándem y las técnicas genético-moleculares (20); y finalmente desde utilizar formatos de análisis del tipo “1 ensayo : 1 analito : 1 patología detectada” a emplear plataformas de ensayo del tipo multiplex en las cuales a partir de un único análisis se pueden medir múltiples analitos y de esa forma, detectar múltiples enfermedades (21).

Sin embargo, este proceso evolutivo no estuvo determinado solamente por el avance en las técnicas de pesquisa, sino que también han intervenido otros factores como son el surgimiento de nuevas alternativas para el diagnóstico y el manejo terapéutico de los casos detectados, y la potencialidad actual que ofrecen los tratamientos modernos.

En contraposición con esta evolución, los criterios de Wilson y Jungner para la selección de enfermedades a pesquisar se han mantenido prácticamente inalterados a lo largo del tiempo, lo cual motivó que desde fines de los '90 y durante el comienzo de los '2000 hayan surgido numerosas publicaciones cuestionando a dichos criterios sobre la base de que los mismos requerían una modernización y flexibilización acorde con los avances tecnológicos y terapéuticos obser-

vados (22-28), y en el hecho de que los mismos estaban formulados en términos cualitativos y sin un punto final claro, lo cual limitaba su aplicabilidad como herramienta de decisión (29-32), hechos que ameritaron su optimización.

En consonancia con dichos cuestionamientos, y con la finalidad de definir un panel uniforme de Pesquisa Neonatal para todos los estados de los EE.UU., el American College of Medical Genetics (ACMG) coordinó en 2005 uno de los trabajos más importantes en este sentido, el cual fuera publicado un año después (31-32). En dicho documento se establece que los criterios de Wilson y Jungner son difíciles de cuantificar, que no permiten establecer un ranking de prioridades entre las diferentes enfermedades en forma comparativa, y que además son inadecuados para evaluar enfermedades que presentan marcadores similares o superpuestos, o que pueden ser detectadas utilizando tecnologías del tipo multiplex, pero que a su vez pueden variar en sus rasgos analíticos y clínicos.

La modalidad seguida en dicho trabajo consistió en definir inicialmente 11 principios básicos de la Pesquisa Neonatal y 19 criterios de evaluación clínicos, analíticos y de diagnóstico, tratamiento y seguimiento, a cada uno de los cuales les fue asignado un puntaje. Posteriormente, se estableció un ranking de puntuación sobre un grupo de 84 enfermedades congénitas de etiología diversa y que habían sido seleccionadas previamente, y de acuerdo con las calificaciones asignadas a cada patología por parte de un grupo de 289 expertos, quienes calificaron a las mismas haciendo uso de los criterios de evaluación antes mencionados. Por último, se reevaluó cada patología en base a las evidencias científicas y bibliográficas disponibles con la finalidad de que, en caso de no encontrarse una correspondencia absoluta entre el puntaje asignado inicialmente y dichas evidencias, se efectuara una re-categorización de las mismas.

Los resultados finales de la evaluación determinaron que las más altas puntuaciones correspondieron a la Deficiencia de Acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCADD), al Hipotiroidismo Congénito y a la Fenilcetonuria, seguidos por la Deficiencia de Biotinidasa, la Anemia Falciforme y la Hiperplasia Suprarrenal Congénita. De éste modo, fueron definidos 4 grupos o categorías (31-32):

- a) Un Panel Central “recomendado” de 29 enfermedades consideradas aptas para la Pesquisa Neonatal y recomendadas como de realización obligatoria (Tabla 4).
- b) Un Panel Secundario constituido por 25 enfermedades cuya detección se produce como parte del diagnóstico diferencial de alguna de las enfermedades del Panel Central, y que deberían reportarse al médico y a la familia cuando las mismas son detectadas (Tabla 5).
- c) Un grupo constituido por otras 27 enfermedades identificadas como no aptas para la realización de la Pesquisa Neonatal, ya sea por la ausencia de pruebas de pesquisa o porque reúnen muy pocos de los criterios de evaluación definidos.
- d) Otras 3 enfermedades cuya evaluación fue diferida por no contarse con especialistas específicos dentro del grupo de expertos consultados (HIV, Toxoplasmosis y Citomegalovirus).

Tabla 4. Panel central recomendado por el ACMG de EE.UU.

Acidurias Orgánicas	Defectos de oxidación de ácidos grasos
1. Acidemia metilmalónica (Deficiencia de mutasa). 2. Acidemia metilmalónica (Deficiencia de Cbl A, B). 3. Deficiencia de 3-metilcrotonil CoA carboxilasa. 4. Acidemia isovalérica. 5. Acidemia glutárica tipo I. 6. Aciduria 3-OH 3-metil glutárica. 7. Deficiencia múltiple de carboxilasas. 8. Acidemia propiónica. 9. Deficiencia de β -cetotilasa.	1. Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena media (MCAD). 2. Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena muy larga (VLCAD). 3. Deficiencia de 3OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena larga (LCHAD). 4. Deficiencia de proteína trifuncional. 5. Defecto de captura de carnitina.
Aminoácidopatías	Otras enfermedades
1. Fenilcetonuria. 2. Enfermedad de orina de jarabe de arce. 3. Homocistinuria. 4. Citrulinemia. 5. Acidemia arginino-succínica. 6. Tirosinemia tipo I.	1. Hipotiroidismo Congénito. 2. Deficiencia de Biotinidasa 3. Hiperplasia Suprarrenal Congénita. 4. Galactosemia clásica (Deficiencia de Galactosa-1-fosfato uridil transferasa). 5. Defectos de la audición. 6. Fibrosis quística.
Hemoglobinopatías	
1. Anemia falciforme. 2. Anemia falciforme/ β -talasemia. 3. Anemia falciforme/Enfermedad Hb C.	

Con respecto al grupo de enfermedades que fueron incluidas dentro del Panel Central recomendado por el ACMG, todas cumplen con los siguientes 3 criterios:

- pueden ser detectadas en una fase en la cual no es posible el diagnóstico clínico,
- existe disponibilidad de una prueba de detección con apropiada sensibilidad y especificidad, y
- existen beneficios demostrados de la detección temprana, intervención oportuna y eficacia del tratamiento.

Por otra parte es importante mencionar que 20 de estas 29 enfermedades pueden ser detectadas empleando una tecnología de tipo multiplex como lo es la espectrometría de masa en tándem, lo cual es, además, un claro indicador del cambio trascendente que experimentó el rumbo de la Pesquisa Neonatal a partir de la década del 2000.

Tabla 5. Panel secundario del ACMG de EE.UU.

Acidurias Orgánicas	Defectos de oxidación de ácidos grasos
<ol style="list-style-type: none"> 1. Acidemia metilmalónica (Deficiencia de Cbl C, D). 2. Acidemia malónica. 3. Deficiencia de isobutiril-CoA deshidrogenasa. 4. Aciduria 2-metil 3-OH butírica. 5. Deficiencia de 2-metilbutiril-CoA deshidrogenasa. 6. Aciduria 3-metil glutacónica. 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Deficiencia de acil-CoA deshidrogenasa de cadena corta (SCAD). 2. Acidemia glutárica tipo II. 3. Deficiencia de 3OH-acil-CoA deshidrogenasa de cadena media y corta (M/SCHAD). 4. Deficiencia de ceto acil-CoA tiolasa de cadena media (MCKAT). 5. Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa II (CPT2). 6. Deficiencia de dienoil CoA reductasa 7. Deficiencia de carnitina:acilcarnitina translocasa 8. Deficiencia de carnitina palmitoil transferasa I (CPT1) (Hepática)
Aminoácidopatías	
<ol style="list-style-type: none"> 1. Hiperfenilalaninemias persistentes. 2. Deficiencia de bipterinas (biosíntesis). 3. Deficiencia de bipterinas (reciclado). 4. Hipermetioninemia. 5. Argininemia. 6. Tirosinemia tipo II. 7. Tirosinemia tipo III. 8. Citrulinemia tipo II. 	
Otras enfermedades	Hemoglobinopatías
<ol style="list-style-type: none"> 1. Deficiencia de Galactokinasa 2. Deficiencia de UDP-Galactosa-4-epimerasa 	<ol style="list-style-type: none"> 1. Variantes de hemoglobinas anormales (incluyendo Hb E)

Además, y si bien resulta claro que los criterios empleados por el ACMG pueden presentar algunos aspectos subjetivos, éste es el primer intento de una evaluación comparativa y “cuantitativa” que se realiza de las diferentes enfermedades congénitas potencialmente pesquisables para una población determinada, en la cual, inclusive, se recomendó la Pesquisa Neonatal obligatoria de algunas enfermedades cuya inclusión en los paneles de pesquisa no hubiera sido indicada en caso de que la selección se hubiera llevado a cabo empleando exclusivamente los criterios de Wilson y Jungner.

Por último, se debe destacar que, más allá de que el objetivo primario del proyecto ejecutado por el ACMG se limitó a la definición de un panel uniforme de enfermedades a investigar en todos los estados de los EE.UU. y el mismo se concretó rápidamente en 2006, el proceso de incorporación de nuevas enfermedades al mencionado panel quedó abierto y sujeto a un proceso dinámico, toda vez que su pesquisa, diagnóstico y tratamiento fuera factible, y que las nuevas patologías propuestas se ajustaran a los criterios de selección previamente definidos.

En función de esto, el panel recomendado definido originalmente en 2006 que comprendía un total de 29 enfermedades se expandió a un total de 35 condiciones al año 2019, siguiendo la secuencia de incorporación de nuevas enfermedades detallada a continuación:

- 2010: Inmunodeficiencia Combinada Severa (SCID) (33).
- 2011: Enfermedad Cardíaca Congénita Crítica (CCHD) (6,7).
- 2013: Enfermedad de Pompe (34,35).
- 2014: Adrenoleucodistrofia Ligada al X (X-ALD) (36) y Mucopolisacaridosis Tipo I (MPS I) (34,35).
- 2018: Atrofia Muscular Espinal (SMA) (37).

Futuro de la Pesquisa Neonatal

La evaluación retrospectiva de los diferentes factores que han influenciado el rumbo de la Pesquisa Neonatal a lo largo de su historia sugiere que el surgimiento de nuevas formas de diagnóstico, ya sea tanto a través del desarrollo de nuevas tecnologías como del hallazgo de nuevos marcadores bioquímicos o moleculares, sumado al descubrimiento de nuevas alternativas de tratamiento y de nuevas medidas preventivas, son las variables que impulsaron a evaluar la decisión acerca de si una enfermedad determinada resultaba apropiada para considerar su inclusión en un programa de Pesquisa Neonatal (38), y por lo tanto estas mismas variables serán las que determinarán la dirección que la pesquisa ha de tomar en el futuro.

Considerando estos aspectos, en la actualidad es posible plantear al menos 4 grupos de patologías que pueden ser detectadas a través de la determinación de marcadores bioquímicos o moleculares que incluyen la Distrofia Muscular Duchenne (DMD), el Síndrome de X-Frágil, la Xantomatosis Cerebrotendinosa y otras Enfermedades Lisosomales como son Gaucher, Fabry, Niemann-Pick y Krabbe, como candidatas a ser incluidas en los paneles de enfermedades a pesquisar en un futuro cercano.

No obstante esto, no se debe ignorar que la expansión de la Pesquisa Neonatal requiere necesariamente de una reconsideración de su infraestructura ya sea tanto para la ejecución de las pruebas de pesquisa como para el diagnóstico, educación, consejo genético, tratamiento y seguimiento de los casos detectados, hechos que sin lugar a dudas dan lugar a que los aspectos económicos adquieran un rol preponderante, y que consecuentemente puedan constituirse en un factor limitante del proceso de expansión (39).

¿Pesquisa Genómica?

Por último, no se debe pasar por alto que una de las principales perspectivas que se plantea en relación al futuro de la Pesquisa Neonatal está relacionada al surgimiento ya hace varios años atrás de una nueva tecnología para el secuenciamiento completo del genoma denomina-

da *Next Generation Sequencing* o Secuenciamiento de Próxima Generación la cual se basa en un secuenciamiento masivo, simultáneo y automatizado del material genético que permite completar el análisis de un genoma completo en apenas algo más de 24 horas.

De este modo, dada la disponibilidad actual de esta tecnología a costos relativamente accesibles -al menos para países desarrollados-, y aplicando un principio de razonamiento lógico que establece que las mejores oportunidades para implementar acciones preventivas en un individuo afectado por una enfermedad genéticamente determinada se presentan precisamente inmediatamente después del nacimiento, es que se propone a la Pesquisa Neonatal como un vehículo para proyectar los avances genómicos y genéticos en beneficio de la salud de la población utilizando dicha tecnología como método de *screening* primario, dando lugar así a un cambio sustancial en el paradigma de la Pesquisa Neonatal la cual pasaría de ser una pesquisa mayoritariamente bioquímica a ser una pesquisa genómica (40).

Independientemente de estas afirmaciones, los hechos demuestran que en la actualidad aún no están dadas las condiciones para que este cambio se pueda llevar a cabo por las razones que se enumeran a continuación:

- a) La existencia de una clara disociación entre lo que resulta tecnológicamente posible, es decir entre la factibilidad de disponer de técnicas para el secuenciamiento del genoma, y aquello que los servicios de salud disponibles pueden ofrecer hoy día para la atención de los casos detectados.
- b) La necesidad de disponer de consentimientos informados para habilitar la realización de estas pruebas.
- c) La falta de definición en lo que respecta a lineamientos éticos relacionados a las implicancias que tiene la realización de este tipo de estudios, al menos en los siguientes aspectos:
 - cuanta información debe reportarse de los hallazgos resultantes del estudio genómico.
 - cómo se debe manejar la información en el caso de individuos portadores de mutaciones severas o mutaciones causantes de formas de presentación en la edad adulta o a edad incierta.
 - el hallazgo de factores de susceptibilidad, a fin de evitar el riesgo de estigmatización.
 - cómo se deben administrar informaciones relacionadas con hallazgos incidentales como paternidad, consanguinidad, riesgo reproductivo e información farmacogenómica.
- d) La ausencia de un marco regulatorio en cuanto a la confidencialidad de los registros médicos y al riesgo de que esta información se filtre llegando a los seguros de salud, o a que de lugar a eventos de discriminación laboral.
- e) El incremento dramático que se produciría en el número de desórdenes detectados, ya sea metabólicos o no metabólicos, tratables o no tratables, prevenibles o no prevenibles, de presentación temprana o en la edad adulta, de origen monogénico o causadas por múltiples genes.

- f) La necesidad de disponer de un soporte bioinformático consistente para identificar las diferentes variantes genómicas de significación incierta (VUS) que se van a ir detectando y que contribuya, por un lado, a definir cómo deben ser interpretadas las mismas y, por el otro, al conocimiento tanto de su impacto funcional como del potencial incremento en la tasa de falsos positivos que un mal conocimiento de las mismas podría acarrear.
- g) La necesidad de reformar el sistema de salud pública para el posterior manejo de la información generada y para llevar a cabo la capacitación de equipos de salud especializados en genética y genómica.

Probablemente una de las posiciones mejor definidas y fundamentadas en relación a la potencial incorporación del secuenciamiento completo del genoma como parte de la Pesquisa Neonatal sea la establecida por la Global Alliance for Genomics and Health (GA4GH) a través de una publicación (41) en la cual se lleva a cabo la declaración de ocho principios, de los cuales los cuatro primeros establecen que la pesquisa genómica sólo puede implementarse en la actualidad si se garantiza la equidad de acceso a todos los individuos, si existe un claro conocimiento de las diferentes variantes que se puedan llegar a detectar a través de las bases de datos públicas que deberán ir confeccionándose con el paso del tiempo, si se aplica a enfermedades diagnosticables y tratables o prevenibles, y si su forma de implementación es a través de programas con un alcance integral.

Tomando en consideración estas afirmaciones se puede concluir que actualmente el sistema de salud aún no está preparado para implementar la pesquisa genómica, que la misma sólo debería utilizarse como un complemento a los programas basados en la determinación de marcadores bioquímicos/moleculares/funcionales, pero restringiendo su alcance al análisis de determinados genes específicos causantes de enfermedades para las cuales exista una correlación fenotipo-genotipo bien entendida, una historia natural bien conocida y un balance beneficios/daños favorable, y sin olvidar que algunas enfermedades como el Hipotiroidismo Congénito no puede ser detectado empleando esta tecnología en todos aquellos casos cuya etiología resulta de un defecto no genéticamente determinado en la formación de la glándula tiroides durante la embriogénesis.

De acuerdo a este panorama, es posible presuponer que en los próximos años se experimentará una expansión en el espectro de enfermedades a investigar, el cual potencialmente podrá alcanzar un número significativo de enfermedades congénitas severas que actualmente no tienen acceso a los beneficios de la misma. No obstante esto, no se debe perder de vista el objetivo real de la Pesquisa Neonatal y se debe evitar abordar aspectos no previstos como puede ser la detección de desórdenes con poca o ninguna significación clínica, la búsqueda neonatal de enfermedades de presentación en la edad adulta, o la detección de factores de susceptibilidad para padecer una enfermedad determinada tal como ya fuera establecido hace más de 50 años por Wilson y Jungner (38).

Referencias

1. Bickel H. "Rationale of Neonatal Screening in Inborn Errors of Metabolism" en "Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism". Bickel H, Guthrie R and Hammersen G Eds, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1-6, 1980.
2. Therrell BL, Panny SR, Davidson A, Eckman J, Hannon WH, Henson MA, Hillard M, Kling S, Levy HL, Meaney FJ, McCabe ERB, Mordaunt V, Pass K, Shapira E and Tuerck J. "U.S. Newborn Screening System Guidelines: Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services". *Screening* 1, 135-47, 1992.
3. Pass KA, Lane PA, Fernhoff PM, Hinton CF, Panny SR, Parks JS, Pelias MZ, Rhead WJ, Ross SI, Wethers DL and Elsas LJ; "U.S. Newborn Screening System Guidelines II: Follow-up of Children, Diagnosis, Management, and Evaluation Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN)". *Journal of Pediatrics* 137, S1-S46, 2000.
4. Centers for Disease Control and Prevention, "Ten Great Public Health Achievements-United States, 2001-2010", *Morbidity and Mortality Weekly Report* 2011. Recuperado de www.cdc.gov/mmwr/pdf/wk/mm6019.pdf.
5. Shearer AE, Shen J, Amr S et al, "A Proposal for Comprehensive Newborn Hearing Screening to Improve Identification of Deaf and Hard-of-Hearing Children", *Genetics in Medicine* (2019) <https://doi.org/10.1038/s41436-019-0563-5>
6. Mahle WT, Martin GR, Beekman RH et al, "Endorsement of Health and Human Services Recommendation for Pulse Oximetry Screening for Critical Congenital Heart Disease", *Pediatrics*, 129, 190-192, 2011.
7. Peterson C, Ailes E, Riehle-Colarusso T et al, "Late Detection of Critical Congenital Heart Disease Among US Infants. Estimation of the Potential Impact of Proposed Universal Screening Using Pulse Oximetry", *JAMA Pediatr.*, doi:10.1001/jamapediatrics.2013.4779, 2014.
8. Slazyk WE and Hannon WH; "Quality Assurance in the Newborn Screening Laboratory" en "Laboratory Methods for Neonatal Screening". Therrell BL Ed, American Public Health Association, Washington, 23-46, 1993.
9. Berry S, "Newborn Screening", *Clin. Perinatol*, 42 (2), 441–453, 2015.
10. CLSI. *Newborn Screening for Preterm, Low Birth Weight, and Sick Newborns*. 2nd ed. CLSI guideline NBS03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
11. Committee on Genetics – American Academy of Pediatrics; "Issues in Newborn Screening". *Pediatrics*, 89, 345-349, 1992.
12. Cuckle HS and Wald N. "Tests Using Single Markers" en "Antenatal and Neonatal Screening". Wald N and Leck I Eds, Second Edition, Oxford University Press, Oxford New York, 1-22, 2000.
13. Guthrie R; "Organization of a Regional Newborn Screening Laboratory" en "Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism". Bickel H, Guthrie R and Hammersen G Eds, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 259-270, 1980.
14. Guthrie R. "Mass Screening for Genetic Disease". *Hospital Practice*, 7, 93-100, 1972.

15. Borrajo GJC, “Pesquisa Neonatal de Enfermedades Congénitas”, Tesis Doctoral, <https://doi.org/10.35537/10915/42046>, 2011.
16. Guthrie R and Susi A. “A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants”. *Pediatrics* 32, 338-43, 1963.
17. Bickel H, Gerrard J and Hickmans EM. “Influence of Phenylalanine Intake on Phenylketonuria”. *Lancet* 2, 812-3, 1953.
18. Bickel H, Gerrard J and Hickmans EM. “The Influence of Phenylalanine Intake on the Chemistry and Behaviour of a Phenylketonuria Child”. *Acta Paediatr* 43, 64-71, 1954.
19. Wilson JM and Jungner G. “Principles and Practice of Screening Disease”. *Public Health Papers* N° 34. Geneva: World Health Organization, 26-39, 1968.
20. McCabe L, Therrell B and McCabe E. “Newborn Screening: Rationale for a Comprehensive, Fully Integrated Public Health System”. *Molecular Genetics and Metabolism* 77, 267-73, 2002.
21. Duane A and van Dyck P. “A Vision of the Future of Newborn Screening”. *Pediatrics* 117, S350-S354, 2006.
22. Therrell BL. “U.S. Newborn Screening Policy Dilemmas for the Twenty-First Century”. *Molecular Genetics and Metabolism*, 74, 64-74, 2001.
23. Pollit RJ. “Introducing New Screens: Why are we all doing different things?”. *J Inherit Metab Dis*, 30, 423-9, 2007.
24. Levy HL. “Dilemmas in Newborn Screening”. *Southeast Asian J Trop Med Public Health*, 30 [Suppl 2], 11-13, 1999.
25. Farriaux JP. “Les critères de Wilson en... l’an 2000. Editorial. *La Depeche*, 28, 1998.
26. Howse JL and Katz M. “The Importance of the Newborn Screening”. *Pediatrics*, 106, 595, 2000.
27. Cunningham G. “The Science and Politics of Screening Newborns”. Editorial. *N Engl J Med*, 346, 1084-1085, 2002.
28. Pollit RJ, Green A, Mc Cabe CJ, Booth A, Cooper NJ, Leonard JV et al. “Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism: Cost, Yield and Outcome”. *Health Technol Assess*, 1, 137-140, 1997.
29. Dhondt JL. “Neonatal Screening: from the ‘Guthrie age’ to the ‘Genetic Age’ ”. *J Inherit Metab Dis*, 30, 418-22, 2007.
30. Pollit RJ. “International Perspectives on Newborn Screening”. *J Inherit Metab Dis*, 29, 390-6, 2006.
31. American College of Medical Genetics, “Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System”. *Genet Med* 8 (Supplement 1), S1-S252, 2006.
32. American College of Medical Genetics, “Newborn Screening: Toward a Uniform Screening Panel and System – Executive Summary”. *Pediatrics* 117, S296-S307, 2006.
33. Gaspar HB, “A Practical Guide to Implementing Population Newborn Screening (NBS) for Severe Combined Immunodeficiency (SCID)”. *Int. J. Neonatal Screen.* 3, 29; doi:10.3390/ijns3040029, 2017.

34. Zhou H, Fernhoff P, Vogt RF, “Newborn Bloodspot Screening for Lysosomal Storage Disorders”, *Journal of Pediatrics*, 159 (1), 7–13, 2011.
35. Tortorelli S, Turgeon CT, Gavrilov DK et al, “Simultaneous Testing for 6 Lysosomal Storage Disorders and X-Adrenoleukodystrophy in Dried Blood Spots by Tandem Mass Spectrometry”, *Clinical Chemistry* 62 (9), 1248–1254, 2016.
36. Moser AB, Jones RO, Hubbard WC et al, “Newborn Screening for X-Linked Adrenoleukodystrophy”, *Int. J. Neonatal Screen.* 2, 15; doi:10.3390/ijns2040015, 2016.
37. Phan HC, Taylor JL, Hannon H et al, “Newborn Screening for Spinal Muscular Atrophy: Anticipating an imminent need”, *Seminars in Perinatology*, 39, 217-229, 2015.
38. Wilcken B. “Recent Advances in Newborn Screening”. *J Inherit Metab Dis*, 30, 129-33, 2007.
39. Dhondt JL. “Expanded Newborn Screening: Social and Ethical Issues”. *J Inherit Metab Dis*, 33 (Suppl 2), S211-S217, 2010.
40. Knoppers BM, Sénécal K, Borry P, Avaré D, “Whole Genome Sequencing in Newborn Screening Programs”, *Science Translational Medicine*, 6 (229), DOI: 10.1126/scitranslmed.3008494, 2014.
41. Friedman JM, Cornel MC, Goldenberg AJ et al, “Genomic Newborn Screening: Public Health Policy Considerations and Recommendations”, *BMC Medical Genomics*, 10 (9), DOI 10.1186/s12920-017-0247-4, 2017.

CAPÍTULO 2

Organización de un Programa de Pesquisa Neonatal

Introducción

Las tareas de organización e implementación de un programa de Pesquisa Neonatal requieren que previamente a la puesta en marcha del mismo se realice un profundo y detallado análisis de todos aquellos aspectos que han de incidir sobre las mencionadas actividades a efectos de poder determinar con precisión cuales son las fortalezas y debilidades existentes en la región en la cual tendrá definido su alcance, y de posibilitar de esta forma el acceso a un correcto diagnóstico de situación.

A lo largo de todo el proceso de planificación siempre se debe tomar en consideración que las estrategias de implementación y funcionamiento de un programa de Pesquisa Neonatal presentan una muy fuerte dependencia de factores geográficos, políticos y económicos (1). Los factores geográficos juegan un rol crítico a nivel logístico, es decir en lo que respecta a las comunicaciones, transporte de muestras, localización y derivación de recién nacidos puesto que cada una de estas actividades resulta influenciada en forma directa por los accidentes geográficos, por la disponibilidad de vías de comunicación adecuadas y por la amplitud de la región; en tanto que los factores políticos y económicos son determinantes en lo que se refiere a la definición del número y tipo de patologías a incluir, en la definición de las estrategias de pesquisa a utilizar y, fundamentalmente, en el establecimiento de las fuentes de financiamiento del programa.

La realización de un apropiado diagnóstico de situación previo a la implementación de un programa permitirá efectuar no solamente una planificación adecuada del mismo sino también una correcta asignación tanto de los recursos humanos como económicos, y fundamentalmente, encontrar soluciones apropiadas y acordes a las necesidades existentes.

No obstante estos conceptos, resulta importante dejar en claro que en la actualidad no hace falta “inventar nuevamente la rueda”, y que por lo tanto el desarrollo de un programa de Pesquisa Neonatal debe ser construido sobre la base y experiencia de más de cinco décadas de organización exitosa de diferentes sistemas de Pesquisa Neonatal a lo largo de todo el mundo. Esto significa que, a pesar de que la experiencia demuestra que los obstáculos y desafíos que deben enfrentar los programas de Pesquisa Neonatal en vías de implementación siguen exis-

tiendo, los errores cometidos previamente por otros no deben ser repetidos y debe aprovecharse la experiencia de quienes han transitado y allanado el camino con anterioridad (2).

Para lograr esto resulta esencial que no se realicen acciones aisladas e individuales y que se establezcan colaboraciones entre programas ya desarrollados y en vías de organización, de forma tal de poder tener acceso al aprendizaje necesario para desarrollar estrategias exitosas de implementación, y de esta forma evitar un gasto infructuoso de tiempo, recursos y energía.

Aspectos a considerar en la definición del diagnóstico de situación

Legislación

Se deberá contemplar si existe legislación vigente a nivel nacional, estatal o provincial referida a la realización de las pruebas de pesquisa o a la ejecución de los programas de Pesquisa Neonatal, a partir de lo cual pueden presentarse diferentes situaciones:

- Si al momento de organizar el programa ya existe alguna ley referida a la Pesquisa Neonatal, se contará con un elemento importante en favor de una rápida implementación del mismo. En estos casos deberán analizarse cuales son los contenidos de dicha ley y si existe una reglamentación de la misma.
- En algunos casos existen leyes que sólo contemplan la obligatoriedad de la realización de las pruebas de Pesquisa Neonatal para determinadas patologías pero sin contemplar otros aspectos de la misma. En estos casos, la legislación hará una contribución significativa para poder alcanzar una mayor cobertura en menor período de tiempo, pero, indudablemente, quedarán descubiertos aspectos relacionados con la confirmación, tratamiento y seguimiento de los casos detectados, lo cual a la larga redundará en una menor eficiencia del programa en su conjunto.
- La mayor utilidad de las leyes vinculadas con la Pesquisa Neonatal se presenta cuando las mismas no sólo contemplan la obligatoriedad de la realización de las pruebas de laboratorio, sino que también prevén la confirmación, tratamiento y seguimiento de los casos detectados, y el origen de los recursos financieros que serán utilizados para solventar el funcionamiento global del programa a lo largo del tiempo.
- Otro punto importante a tomar en consideración es que estas leyes pueden estar definidas solamente para dar cobertura a algunas patologías sin posibilidad de inclusión de otras nuevas, o bien puede darse una situación menos rígida como la que se presenta en aquellos casos en los que la lista de enfermedades a pesquisar queda abierta a una potencial ampliación posterior.
- En aquellos casos en los que no existe legislación se deberá tomar en consideración que si se va a trabajar sobre un proyecto de ley para un programa de Pesquisa Neona-

tal, las implicancias de las leyes a formular deberán ser tales que, por un lado, ofrezcan la mayor cantidad de beneficios en cuanto a las posibilidades de implementación y desarrollo del programa, pero por el otro, que el alcance de las mismas no sea excesivamente ambicioso al punto de que la obligatoriedad definida exceda o comprometa las posibilidades reales del programa.

Recursos Humanos

Se deberá prever cuáles serán los recursos humanos que estarán afectados a las tareas del programa.

- En general, cuando se lleva a cabo la implementación de un programa de Pesquisa Neonatal son muy pocos los recursos humanos genuinos que se designan, y en la mayor parte de los casos se procede efectuando una asignación de tareas y responsabilidades a personal previamente designado en hospitales públicos y maternidades o laboratorios del sector privado.
- En vista de la aseveración anterior y de que la Pesquisa Neonatal requiere la participación de un equipo multidisciplinario de salud, se deberá evaluar si se cuenta con el personal apropiado para poder llevar a cabo las tareas específicas en los distintos niveles de ejecución, y establecer además una escala de responsabilidades según las tareas asignadas a cada uno de ellos (1).

Educación y difusión

Se deberá evaluar si existe una estrategia definida para llevar a cabo la educación y difusión del programa, y si se cuenta además con los elementos y el financiamiento necesarios para la ejecución de la misma.

- El proceso educativo deberá estar dirigido al personal de salud afectado a cada una de las tareas del programa y deberá incluir tanto la capacitación como la formación del mismo. Su planificación deberá efectuarse de manera tal que dicho personal tenga acceso a un conocimiento detallado de todas las actividades y procedimientos del programa, las responsabilidades que les competen y los tiempos óptimos de ejecución de cada tarea.
- La educación deberá ser un proceso prioritario, sistemático y continuo, para cuya ejecución podrán emplearse distintas estrategias que incluyen charlas, videos, cursos, seminarios y simposios de entrenamiento y concientización (2). Estas actividades deberán complementarse además con manuales de procedimientos escritos que sean suficientemente claros y concisos a fin de facilitar su comprensión y aplicación.

En el caso del personal de salud que tiene a su cargo las tareas específicas correspondientes al laboratorio de pesquisa y al centro de atención especializada encargado de la confirmación diagnóstica, el tratamiento y el seguimiento de los casos detectados, resulta recomendable la planificación de rotaciones o pasantías en programas de Pesquisa Neonatal afianzados y reconocidos por su trayectoria, y también la convocatoria de expertos externos a efectos de que, a través de visitas científicas periódicas, brinden su asesoramiento y asistencia técnica (2,3).

Adicionalmente, el proceso educativo también deberá estar dirigido a políticos y responsables de la toma de decisiones políticas en Salud Pública, los cuales pueden resultar sumamente importantes para asegurar la sustentabilidad del Programa. En estos casos, y a efectos de evitar una interpretación errónea que pueda conducir a pensar que la Pesquisa Neonatal se trata solamente de una prueba de laboratorio, la educación deberá enfocarse poniendo el mayor énfasis posible en asegurar que se realice una transmisión apropiada del concepto de Pesquisa Neonatal y de sus objetivos. Por otra parte, la misma deberá complementarse con documentación que ponga en evidencia en forma contundente los resultados y beneficios obtenidos por otros programas ya implementados previamente, los propios resultados que pudieran haberse obtenido en una experiencia piloto previa, las consecuencias de una enfermedad congénita no tratada, los beneficios resultantes de la detección y tratamiento precoz ilustradas de una manera gráfica y simple, y finalmente, los costos estimativos del programa desarrollados en forma concisa y preferentemente desde el punto de vista del costo beneficio resultante.

En esta última tarea puede resultar de vital importancia la asistencia de expertos externos ya sea tanto a través de visitas personales como del envío de documentos escritos, y también la participación de diferentes grupos de padres sensibilizados con la detección de enfermedades congénitas (4).

- En cuanto a la difusión, el programa de Pesquisa Neonatal debe ser promovido y difundido en forma continua a nivel de la comunidad pública, antes de su implementación y una vez que el mismo ya haya sido puesto en funcionamiento, para lo cual es indispensable la correcta información y concientización de la población en general acerca de los objetivos y beneficios reales del programa.

Las estrategias a utilizar para ejecutar esta tarea incluyen la entrega de folletos explicativos a padres y madres -tanto durante los cursos de parto como también inmediatamente después de haberse producido el nacimiento del niño-, la presentación de charlas y videos, y la colocación de posters o afiches en lugares públicos, maternidades, laboratorios y centros asistenciales (2,4-5).

Por otra parte, y en caso de que se pretenda lograr una difusión de acceso masivo puede recurrirse a campañas a través de medios de difusión pública como diarios, revistas de actualidad, radio y televisión, y también a través de la emisión periódica de comunicados de prensa (2,5).

Efectores para la recolección de muestras de sangre

Se deberá determinar si existe personal capacitado para llevar a cabo la recolección de las muestras de sangre de los recién nacidos.

- Se deberá definir claramente quienes son los responsables de la recolección de dichas muestras en cada maternidad, ya sea tanto del ámbito público como del ámbito privado, e inclusive también en aquellos casos en los que el parto se produzca en forma domiciliaria o fuera de algunos de los establecimientos antes mencionados.
- En general se establece que la responsabilidad de la toma de muestras recae sobre el personal de salud que se encuentra en el entorno del recién nacido en el momento del nacimiento, y se define una escala de responsabilidades de acuerdo a las funciones desempeñadas.

De este modo, y dependiendo de la organización interna de cada institución, la responsabilidad puede recaer sobre obstetras, parteras, enfermeras, técnicos de laboratorio o de hemoterapia, bioquímicos, médicos residentes, neonatólogos, pediatras o jefes de servicio.

- En el caso de que se produzcan partos domiciliarios se define que la responsabilidad de la toma de muestras recaerá sobre las parteras, padres y/o tutores.

Características de las muestras de sangre

Se deberá evaluar si existe una definición conceptual clara acerca del tipo de muestras de sangre a utilizar, los requisitos que deben cumplir las mismas, y los tiempos óptimos de recolección y envío al laboratorio de pesquisa.

- El tipo y condiciones de muestras de sangre a utilizar dependerá fundamentalmente de las patologías que hayan sido seleccionadas para pesquisar y de las estrategias de pesquisa definidas por el propio programa, siendo las muestras de sangre entera impregnadas en papel de filtro obtenidas por punción de talón las muestras recomendadas (6). A pesar de esto, se debe mencionar que existen algunos ejemplos de programas que aún hoy día utilizan otros materiales biológicos, como por ejemplo sangre entera de cordón impregnada en papel de filtro, material cuya utilidad resulta limitada puesto que son muy pocas las patologías que pueden detectarse a partir del mismo.
- Con respecto a las características de las muestras de sangre, existen normas específicas publicadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) de los EE.UU. (6) en las cuales se establecen las condiciones necesarias para una correcta recolección de muestras. Estas características, al igual que otros aspectos relacionados con las muestras de sangre serán descriptos en detalle en el Capítulo 3.
- En cuanto a los tiempos de recolección de muestras, y tal como ocurre con el tipo de muestras de sangre a utilizar, los mismos deberán ser establecidos en cada programa de acuerdo a las patologías a pesquisar y a las estrategias de trabajo definidas, en tan-

to que la frecuencia de envío de las mismas al laboratorio deberá establecerse de manera tal de asegurar que las muestras lleguen rápidamente y que, en consecuencia, esta etapa no resulte un factor determinante como una potencial causa de retraso en la confirmación diagnóstica e inicio del tratamiento.

Transporte

Se deberán evaluar las alternativas disponibles para llevar a cabo el transporte de las muestras de sangre de los recién nacidos al laboratorio de pesquisa en tiempo y forma.

- Dado que la logística es un punto crítico en relación a la eficiencia que ha de alcanzar un programa de Pesquisa Neonatal, antes del lanzamiento del mismo se deberá definir cuál será el sistema de transporte de muestras a utilizar que permitirá asegurar un traslado seguro y eficiente de las mismas, a un costo razonable.
- En el caso de las instituciones públicas se podrá establecer la utilización de algún sistema de transporte oficial, o bien el uso de las propias ambulancias de los hospitales, mientras que en el caso de las instituciones o laboratorios del sector privado se podrá recurrir a servicios de correo privado o a comisionistas.
- Un punto importante a tomar en consideración es la posibilidad de gestionar un acuerdo de franqueo especial -o en el mejor de los casos de un franqueo exento de pago-, para el envío de las muestras de sangre de recién nacidos a través de algún sistema de servicio postal o *courier* de alcance nacional que asuma la responsabilidad de brindar apoyo logístico al programa de Pesquisa Neonatal (2).

Laboratorios de pesquisa y confirmación

Se deberá evaluar si se cuenta con un laboratorio de pesquisa centralizado, capacitado para analizar eficiente y oportunamente un elevado número de muestras a diario, con métodos de análisis y equipamiento apropiados, y dotado de un estricto sistema de control de calidad interno y externo; y por otra parte si existe disponibilidad de un laboratorio de confirmación capaz de responder en tiempo y forma a la demanda resultante del panel de pruebas requeridas a efectos de poder establecer un diagnóstico definitivo de certeza o de descartar una patología, respaldado por un sistema de calidad apropiado, acorde a las implicancias de las tareas que le competen (2).

En lo que se refiere al Laboratorio de pesquisa, los requisitos y condiciones que debe cumplir el mismo serán discutidos en detalle en el Capítulo 3.

Seguimiento

Se deberá definir un sistema de seguimiento que asegure la continuidad del proceso de Pesquisa Neonatal más allá de lo que implican las pruebas de pesquisa en sí mismas.

- La definición del sistema de seguimiento del programa requiere que se determine quienes serán los responsables de llevar a cabo la localización de aquellos neonatos que así lo requieran, la recolección de nuevas muestras de sangre, el envío de las mismas al laboratorio de pesquisa, la derivación de los recién nacidos al centro de atención especializada para su confirmación diagnóstica, y la localización de aquellos niños con diagnóstico ya confirmado y que por alguna razón no estén cumpliendo con las pautas de seguimiento de tratamiento previamente establecidas.
- En general, este sistema de seguimiento debe estar conformado por un equipo de asistentes sociales, de los cuales un número mínimo debe desempeñar sus funciones a nivel central, es decir coordinando las acciones desde el centro de atención especializada, mientras que el resto debe realizar sus tareas distribuido a lo largo de toda el área de alcance del programa.
- Adicionalmente debe tomarse en consideración que este sistema de seguimiento también será el responsable de monitorear que todas las acciones desencadenadas como parte del algoritmo de trabajo a partir de una muestra mal colectada, del incumplimiento de alguna o varias de las condiciones preanalíticas exigidas para la recolección de muestras, o de un resultado anormal en una prueba de pesquisa sean cumplimentadas en tiempo y forma. En general, esta tarea no es ejecutada por el equipo de asistentes sociales sino que, en razón de la disponibilidad de la información necesaria para tal fin, es ejecutada por el propio laboratorio de pesquisa.

Tratamiento

Se deberá evaluar la disponibilidad de centros de atención especializada que cuenten con recursos humanos e infraestructura de diagnóstico y tratamiento apropiados para llevar a cabo dichas tareas.

- Los principios generales de la Pesquisa Neonatal establecen que para alcanzar una máxima eficiencia en las instancias de confirmación, tratamiento y seguimiento de los casos detectados, es necesario que las mismas sean ejecutadas en forma centralizada a través de centros de atención especializada.
- La conformación de un equipo de médicos especialistas es uno de los elementos clave a considerar para asegurar el correcto funcionamiento de dichos centros. El mencionado equipo médico deberá incluir endocrinólogos especializados en pediatría, neurólogos especializados en el manejo de enfermedades neurometabólicas, genetistas, nutricionistas, neumonólogos, kinesiólogos y psicólogos.

- Por otra parte, los centros de atención especializada deberán contar con infraestructura y herramientas diagnósticas apropiadas de manera tal que les sea posible definir el diagnóstico en forma rápida y eficiente, lo cual en la mayor parte de los casos implicará la realización de pruebas de laboratorio.

No obstante esto, debe tenerse en cuenta que en algunos casos se requerirá también la realización de otro tipo de pruebas, como por ejemplo estudios de diagnósticos por imágenes (rayos X, centellografías) o de ultrasonido (ecografías).

- Un concepto sumamente importante para destacar con referencia al manejo del tratamiento es que no se recomienda bajo ninguna circunstancia que el mismo sea llevado a cabo por médicos clínicos generalistas, por médicos especializados en el manejo de algunas de estas enfermedades pero de presentación en la edad adulta, o en forma aislada en consultorios médicos que no forman parte de la estructura de un programa, puesto que cualquiera de estas circunstancias puede afectar significativamente la eficiencia de dicho tratamiento.
- En cuanto a los tiempos de inicio del tratamiento, los mismos deben ser definidos durante la planificación del programa de Pesquisa Neonatal, para lo cual se debe partir de la premisa de que cuanto más precozmente sea implementado el mismo, mayor será su efectividad.

Habitualmente se define como tiempo óptimo de inicio del tratamiento antes de los 15 días de vida. Sin embargo, debe contemplarse que algunas patologías requieren ser tratadas aún más precozmente, puesto que en caso contrario, puede producirse la muerte del recién nacido por una crisis metabólica aguda o bien instalarse algún tipo de alteración neurológica irreversible a consecuencia de la existencia de una ventana de vulnerabilidad que se pone de manifiesto durante los primeros días de vida.

- Otro elemento a considerar es que el programa debe asegurar la disponibilidad de una fuente confiable para la provisión continua tanto de los medicamentos necesarios para el tratamiento, como de los productos y alimentos especiales utilizados para el manejo terapéutico de muchas de las enfermedades metabólicas pesquisadas.
- La centralización del seguimiento del tratamiento a largo plazo y su evaluación periódica, son una condición fundamental para asegurar el éxito del programa, puesto que de este modo se puede contar con los datos y elementos necesarios para realizar una valoración objetiva de los pro y contras del tratamiento, desarrollar e implementar nuevas alternativas terapéuticas, y contar con una cantidad de casos detectados significativos desde el punto de vista epidemiológico.
- La planificación del tratamiento también debe considerar que el manejo de los casos detectados es un proceso acumulativo, por lo cual se deberá contemplar la incorporación progresiva de recursos humanos y también la factibilidad de una descentralización en etapas avanzadas del seguimiento.

- La transferencia del seguimiento clínico general de los casos detectados a los pediatras de cabecera es un procedimiento que debe ser considerado como una norma a fin de descomprimir la carga de trabajo en el centro de atención especializada.

Fuentes de financiamiento

Se deberá evaluar si existe una partida presupuestaria asignada al programa, por ejemplo a través de la legislación vigente, o bien una fuente de financiamiento estable que permita solventar no solamente las pruebas de pesquisa, sino también el tratamiento y el seguimiento de los casos detectados, la educación del personal, la difusión del programa, y la provisión de los recursos humanos necesarios.

- Sin lugar a dudas, el financiamiento es el problema más dificultoso que deben enfrentar los programas de Pesquisa Neonatal, no sólo en lo referente a la fuente de financiamiento en sí misma sino también en lo que respecta al potencial alcance del Programa y a los métodos de reembolso a utilizar (1).
- En vista de lo expresado anteriormente, el primer punto a definir es quién será el responsable del financiamiento del mismo. Por definición, y por tratarse de un programa de Atención Primaria de la Salud Pública, es el estado quién debería hacerse cargo de crear y proveer el presupuesto necesario para su funcionamiento.

Sin embargo, este financiamiento no necesariamente debe limitarse a los ingresos públicos del estado (1), razón por la cual no es infrecuente encontrar situaciones en las cuales es el sector privado quién financia a los programas, por ejemplo a través de organizaciones no gubernamentales (ONG's), o, inclusive, situaciones en las cuales el estado se hace cargo de organizar y coordinar todas las actividades, pero a través de terceros pagadores de dichas prestaciones.

- Hablar de financiamiento no solamente implica crear el presupuesto para las pruebas de pesquisa, sino también para cubrir la educación, difusión, y el tratamiento y seguimiento de los casos detectados, especialmente en aquellas enfermedades en las que el mismo implica un costo muy elevado, como es el caso por ejemplo de los errores congénitos del metabolismo que requieren un tratamiento dietario con alimentos y/o productos especiales.
- También deberá contemplarse el alcance que tendrá el financiamiento del tratamiento y seguimiento en cuanto al tipo de medicamentos, alimentos y/o productos especiales a proveer, a la posible cobertura por parte de las obras sociales o la seguridad social, y al límite de edad hasta el cual se extenderá la provisión de los mismos.
- Al presupuestar un programa de Pesquisa Neonatal se debe tomar en consideración que una vez que el programa está instalado y funcionando correctamente, cuanto mayor sea la cantidad de patologías pesquisadas menor será el costo relativo del mismo. Esta afirmación se basa en el hecho de que la incorporación de una nueva práctica al panel de pesquisa implicará principalmente la utilización del mismo sistema de comuni-

caciones, equipamiento, personal e infraestructura, y los únicos costos adicionales que se agregarán serán aquellos que corresponden a los reactivos empleados para la realización de las pruebas de laboratorio (pesquisa y diagnóstico) y al tratamiento requerido para los casos detectados con la enfermedad en cuestión.

- Además, se debe tener en cuenta que la centralización de los programas de Pesquisa Neonatal no sólo se basa en un principio de eficiencia sino también en un principio de economía, puesto que cuanto mayor sea la cantidad de muestras analizadas por un laboratorio de pesquisa, entonces mayor será el rendimiento de los reactivos utilizados y menores serán sus costos.

Expansión potencial

Se deberán prever los criterios a utilizar para llevar a cabo la selección e inclusión racional y sistemática de nuevas patologías al programa de Pesquisa Neonatal.

- La selección de las patologías que se han de incluir en el programa de Pesquisa Neonatal se deberá realizar tomando como base los criterios de selección de Wilson y Jungner antes descriptos o eventualmente los criterios definidos por el propio Programa o recomendados por organismos competentes.

Sin embargo, la decisión de incorporar definitivamente una nueva patología al panel de pesquisa dependerá de la prevalencia de la misma -la cual debería ser determinada preferentemente en una prueba piloto previa-, de la composición étnica de la población y de la estimación del costo/beneficio establecido en base a los resultados preliminares de la prueba piloto y a las experiencias previamente publicadas.

- La estimación del costo/beneficio es un procedimiento que en algunos casos particulares, muy especialmente en países subdesarrollados o en vías de desarrollo, es muy difícil de realizar en la práctica, fundamentalmente por 3 razones:
 - a) porque en numerosas ocasiones no existen valoraciones de los costos reales que implican la educación diferencial especializada que requiere un individuo discapacitado física o intelectualmente, y la atención médica y hospitalizaciones requeridas por individuos detectados tardíamente.
 - b) porque en otros casos el estado realiza inversiones mínimas en este tipo de educación, razón por la cual prevenir la discapacidad no se traduce en un ahorro concreto.
 - c) porque no existen modelos que permitan realizar una valoración del costo social que implica el hecho de tener un individuo discapacitado mental en el seno de una familia y de la pérdida de productividad ocasionada por la imposibilidad de inserción de dicho individuo en la sociedad.

Referencias

1. Therrell BL, Panny SR, Davidson A, Eckman J, Hannon WH, Henson MA, Hillard M, Kling S, Levy HL, Meaney FJ, McCabe ERB, Mordaunt V, Pass K, Shapira E and Tuerck J. "U.S. Newborn Screening System Guidelines: Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services". *Screening* 1, 135-47, 1992.
2. International Atomic Energy Agency. "Implementing and Sustaining the Screening Programme" en "Screening of Newborns for Congenital Hypothyroidism. Guidance for Developing Programs". International Atomic Energy Agency Ed., Vienna, 67-88, 2005.
3. Webster D. "Quality Performance of Newborn Screening Systems: Strategies for Improvement". *J Inherit Metab Dis* 30, 576-84, 2007.
4. International Atomic Energy Agency. "Basic Aspects in the Screening of Newborns with Emphasis on the Detection of Hypothyroidism" en "Screening of Newborns for Congenital Hypothyroidism. Guidance for Developing Programs". International Atomic Energy Agency Ed., Vienna, 21-41, 2005.
5. Torresani T. "Quality Control Requirements in Neonatal Screening". *Eur J Pediatr* 162, S54-S56, 2003.
6. CLSI. "Blood Collection on Filter Paper for Neonatal Screening Programs". Approved Standard – Sixth Edition. CLSI Document NBS01-A6, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.

CAPÍTULO 3

Organización de un laboratorio de Pesquisa Neonatal

Introducción

La organización del laboratorio de Pesquisa Neonatal es sin lugar a dudas uno de los procesos de mayor importancia dentro del proceso global de organización de un programa de pesquisa. Esta aseveración se sustenta en el hecho de que el Laboratorio tiene como función principal la identificación de recién nacidos presuntamente afectados dentro de un grupo de recién nacidos aparentemente sanos, lo cual a su vez determina que se trate del único efector centralizado que indefectiblemente va a tomar contacto con toda la población de recién nacidos.

Estas características le confieren al laboratorio un rol protagónico dentro del sistema y le exigen la responsabilidad de emitir resultados oportunos, confiables, seguros y de alta calidad analítica y diagnóstica, y de asegurar que todos sus procedimientos sean ejecutados teniendo presente que el objetivo de la Pesquisa Neonatal va más allá de lo que implica la obtención de un simple resultado en una prueba de laboratorio.

En términos prácticos, tanto la organización como el funcionamiento del laboratorio de Pesquisa Neonatal deben ser un fiel reflejo de la organización del programa en su conjunto, es decir que el mismo debe estar funcionalmente centralizado y geográficamente regionalizado. Esta modalidad de trabajo implica que el laboratorio tendrá un área geográfica definida de alcance y que las muestras de sangre de todos los niños que nazcan en las maternidades de esa región deberán ser remitidas a un único laboratorio que funcionará de manera centralizada y que será el responsable de llevar a cabo el procesamiento de las mismas, hecho que a su vez le permitirá acceder a una serie de beneficios concretos que serán discutidos a continuación.

Sin embargo, y tal como ya ha sido establecido y demostrado en países desarrollados, se debe destacar que no cualquier condición de trabajo centralizada y regionalizada de un laboratorio de pesquisa permitirá acceder a dichos beneficios, sino que por el contrario, y para que esto suceda, el mismo debe procesar un número mínimo de 50.000 muestras al año (1), es decir un promedio del orden de 200 muestras diarias.

Y si bien de todas las consideraciones expuestas hasta el momento queda en claro la importancia que tiene el laboratorio dentro del funcionamiento general de un programa de Pesquisa Neonatal, también se debe reforzar el concepto de que si la pesquisa se plantea como si consistiera solamente en realizar una prueba de laboratorio, obtener un resultado, emitir un informe y entregar el mismo a los padres sin prever todas las acciones posteriores que se deben implementar para confirmar un diagnóstico e implementar el tratamiento oportuno en forma apropiada, se corre un serio riesgo de fracasar y de que no se logre alcanzar el objetivo preventivo.

Beneficios de la Centralización

Los beneficios de la centralización del laboratorio de pesquisa se pueden describir en forma general indicando que a través de la misma es posible alcanzar un máximo rendimiento, eficiencia y confiabilidad en los distintos procesos que se ejecutan en el mismo.

No obstante esto, y dado que existen una serie de beneficios específicos, concretos y mensurables resultantes de dicha centralización, a continuación se presenta una discusión de los mismos abordada desde un punto de vista práctico:

- **Optimización de recursos humanos:** si un programa de Pesquisa Neonatal con alcance en una región determinada en la cual nacen anualmente un número de niños tal que operativamente le permite funcionar con un único laboratorio centralizado decide organizar su funcionamiento a través de varios laboratorios, indefectiblemente deberá disponer para ello de los recursos humanos mínimos necesarios para ejecutar cada una de las actividades que le competen en cada uno de estos laboratorios, incrementando así no sólo dichos requerimientos en una proporción directamente relacionada con la cantidad de laboratorios que se hayan establecido, sino también los costos resultantes de los mismos. En contraposición, el mismo programa funcionando a través de un único laboratorio centralizado podrá resolver la misma cantidad de pruebas con un número mucho menor y optimizado de recursos humanos.
- **Reducción significativa de costos asociada a un máximo rendimiento de reactivos:** continuando con el ejemplo anterior, si las pruebas de pesquisa de dicho programa se centralizan a través de un único laboratorio, en la medida en que el número de muestras que se van a recibir diariamente en el mismo va a ser mayor que lo que ocurriría si las pruebas se ejecutaran a través de varios laboratorios, ocurrirá entonces que el número de muestras analizadas en cada corrida también será mayor. De este modo, centralizando en un único laboratorio, la proporción de calibradores y controles respecto a la cantidad de muestras procesadas por corrida va a disminuir, incrementando así el rendimiento de los reactivos, y reduciendo como consecuencia los costos asociados.
- **Optimización del equipamiento y posibilidad de disponer de equipamiento específico para pruebas de pesquisa:** en el caso del equipamiento a utilizar para la ejecución de las pruebas de pesquisa, la centralización no sólo permite disponer de equipa-

miento específico⁴ sino que, además, y siguiendo un razonamiento similar al considerado para los recursos humanos, permite realizar una reducción de costos. Esta afirmación se basa en que si un programa determinado decide funcionar a través de varios laboratorios en lugar de centralizar su funcionamiento en uno sólo, cada uno de esos laboratorios deberá contar con el equipamiento mínimo necesario para ejecutar sus pruebas, multiplicando así la inversión requerida para tal fin.

- **Eventual automatización:** partiendo de la premisa de que la centralización de las pruebas de pesquisa en un único laboratorio estará asociada a un número de muestras por corrida mayor que si se funcionara a través de varios laboratorios, dicha condición resultará suficiente para justificar la incorporación de equipamiento automatizado específico. El impacto de esta acción se verá reflejado no solo en la estandarización y normatización de los distintos procesos que se ejecutan en el mismo, sino también en la optimización de la calidad de las pruebas, permitiendo así un incremento en el rendimiento, en la capacidad de trabajo y en la productividad del laboratorio, factores que a su vez incidirán en forma directa en la optimización de los recursos humanos afectados a las tareas del laboratorio.
- **Posibilidad de procesamiento diario de muestras:** la centralización de las pruebas de pesquisa en un único laboratorio también determinará que el número de muestras que se reciban diariamente en el mismo sea mayor que en el caso de que el programa funcione a través de varios laboratorios. De esta manera, no será necesario reunir muestras de varios días consecutivos a efectos de incrementar el rendimiento de los reactivos sino que, por el contrario, las mismas podrán ser procesadas a diario haciendo así una contribución significativa y de enorme valor a la reducción en los marcos de tiempos requeridos hasta la llegada al diagnóstico y a la implementación del tratamiento en aquellos casos que corresponda.
- **Mayor probabilidad de muestras con resultados anormales en períodos cortos de tiempo:** dado que la mayor parte de los resultados que se espera obtener en las pruebas de pesquisa son normales, en general en un porcentaje que ronda en el orden del 99.5 al 99.9 %; y dependiendo tanto de la cantidad de muestras que sean procesadas por corrida como de los percentiles establecidos para definir los valores de corte, es factible que en el caso de laboratorios descentralizados se puedan presentar reiteradas corridas sucesivas en las cuales no se obtenga ningún resultado anormal, particularmente cuando el número de muestras a procesar por corrida sea inferior a 200.
- **Detección de casos en números epidemiológicamente significativos:** dada la baja prevalencia de las patologías pesquisadas, si se estuviera trabajando en un laboratorio descentralizado que procese por ejemplo un número de 2.000 muestras al año, muy probablemente a lo largo de todo un año de trabajo no se tenga ni siquiera la posibili-

⁴ Dada la naturaleza de las pruebas y del tipo de muestras de sangre a utilizar, el equipamiento que se emplea en los laboratorios de pesquisa es, en general, diferente del que se utiliza en cualquier laboratorio de análisis clínicos.

dad de detectar un caso de alguna de las patologías incluidas dentro del panel de enfermedades a pesquisar. En contraposición, y considerando el número mínimo recomendado de muestras a analizar por cada laboratorio (50.000/año), anualmente se podrían llegar a detectar entre 40 y 50 casos de niños afectados con alguna de las patologías pesquisadas.

- **Centralización de la información y simplificación del manejo y disponibilidad de la misma:** la centralización del laboratorio permite concentrar la información de todos los recién nacidos pesquisados en un único punto, facilitando así el manejo y disponibilidad tanto de los registros como de la casuística correspondiente a datos estadísticos y epidemiológicos, para su posterior evaluación y determinación de los indicadores de desempeño del programa. De esta manera, la centralización de las pruebas en un único laboratorio elimina la necesidad de tener que recopilar la información desde tantos puntos diferentes como número de laboratorios conformen la estructura del programa cuando se está trabajando con una estructura descentralizada.
- **Mayores posibilidades de validación de los métodos analíticos a utilizar:** si bien el procedimiento de validación de los métodos de pesquisa va a ser discutido en detalle en el Capítulo 5, se debe destacar que se trata de un procedimiento a través del cual va a ser posible garantizar que cada uno de los métodos de medida que se estén utilizando en el laboratorio cumpla con la exigencias de calidad analítica y diagnóstica requeridas antes de la implementación de los mismos en rutina, siendo mayor la factibilidad de su ejecución toda vez que se trabaje en forma centralizada.
- **Mayores posibilidades para la definición de valores de corte propios:** la centralización permite disponer de bases de datos poblacionales en períodos cortos de tiempo de un tamaño tal estadísticamente hablando, que permite llevar a cabo a una apropiada definición de valores de corte propios, trabajando sobre la propia población de recién nacidos y con las propias metodologías de análisis utilizadas por el programa de pesquisa.
- **Implementación de un estricto sistema de control de calidad interno y participación en programas de evaluación externa de calidad:** tanto la implementación sistemática de un sistema de control de calidad interno como la participación en programas de evaluación externa de calidad son dos elementos clave para monitorear el desempeño analítico de los métodos a lo largo del tiempo y garantizar que el mismo se mantenga estable y dentro de los rangos analíticos esperables. Ambas acciones resultan facilitadas por la centralización del laboratorio.
- **Nivel controlado de falsos negativos y falsos positivos:** la ejecución sistemática y apropiada de los cuatro procesos descritos anteriormente, esto es, validación de métodos, definición de valores de corte propios, implementación de un estricto sistema de control de calidad interno y la participación en programas de evaluación externa de calidad, permitirán alcanzar un nivel controlado de falsos negativos y falsos positivos, y de ese modo lograr una mayor confiabilidad diagnóstica del sistema de detección.

Como es sabido, los resultados falsos positivos son los que menor preocupación generan puesto que los niños con este tipo de resultados siempre cuentan con una instancia posterior que va a permitir descartar la patología. Sin embargo, resulta importante dejar en claro que estos falsos positivos siempre deben mantenerse dentro de límites aceptables puesto que si los mismos excedieran dichos límites van a dar lugar a diversos efectos adversos asociados, causando una importante sobrecarga de trabajo en los sistemas de seguimiento del programa, un incremento en los costos, una innecesaria carga de angustia y ansiedad en las familias de los niños con estos resultados, e inclusive un descreimiento o pérdida de confianza por parte de la población en lo que respecta a la confiabilidad, utilidad y beneficio de las pruebas de pesquisa.

En contraposición, los resultados falsos negativos son los que mayor preocupación generan dado que en estos casos los niños son dados de alta y hasta que no se expresa alguna manifestación clínica que permita sospechar la presencia de alguna de las enfermedades pesquisadas, nadie va a pensar en las mismas, y en general, cuando esto ocurre, ya resulta tarde, la posibilidad de implementar un tratamiento se perdió, y de alguna manera se está condenando a ese niño a padecer un daño neurológico o una incapacidad severa de por vida, o inclusive, en el caso particular de alguna de las patologías pesquisadas, a conducirlo a la muerte.

Funcionamiento del laboratorio

La planificación del funcionamiento del Laboratorio requiere considerar dos aspectos fundamentales, por un lado, los recursos humanos responsables de la ejecución de las diferentes actividades que le competen, y por el otro, los diferentes procesos que se llevan a cabo en el mismo.

Recursos humanos

Las características tanto del personal profesional como del personal técnico auxiliar afectados a las tareas técnicas específicas del laboratorio constituyen uno de los principales pilares sobre los que se sustenta el funcionamiento del mismo. Como norma general, se debe tratar de personal altamente motivado, idóneo y competente, con conocimiento de diversas áreas técnicas y entrenado en Pesquisa Neonatal, consciente del impacto e importancia de su trabajo, y capacitado para llevar a cabo apropiadamente la validación de los métodos analíticos, la definición de los valores de corte, la interpretación del control de calidad, y fundamentalmente, para poder realizar una correcta interpretación de los resultados y una apropiada toma de decisiones.

Este equipo debe estar acompañado además por un plantel de personal administrativo capacitado y comprometido con las tareas del laboratorio y del programa en su conjunto, las cuales por su propia naturaleza le exigen un alto rendimiento y eficiencia de trabajo (2).

Distribución de Procesos

Las tareas que se llevan a cabo como parte de las actividades del laboratorio de pesquisa se pueden agrupar en 3 tipos de procesos: procesos preanalíticos, procesos analíticos y procesos post-analíticos. Los mismos están representados esquemáticamente en la Figura 2, en la cual se pone en evidencia además el flujo de tareas que ocurre entre sus dos compartimientos principales, es decir entre el área administrativa y el área de laboratorio propiamente dicha. No obstante esto, es importante destacar que este flujo de tareas puede presentar variaciones mínimas de un laboratorio a otro, pero básicamente se ajusta a la descripción de las tareas que se ejecutan en la mayor parte de los laboratorios de Pesquisa Neonatal.

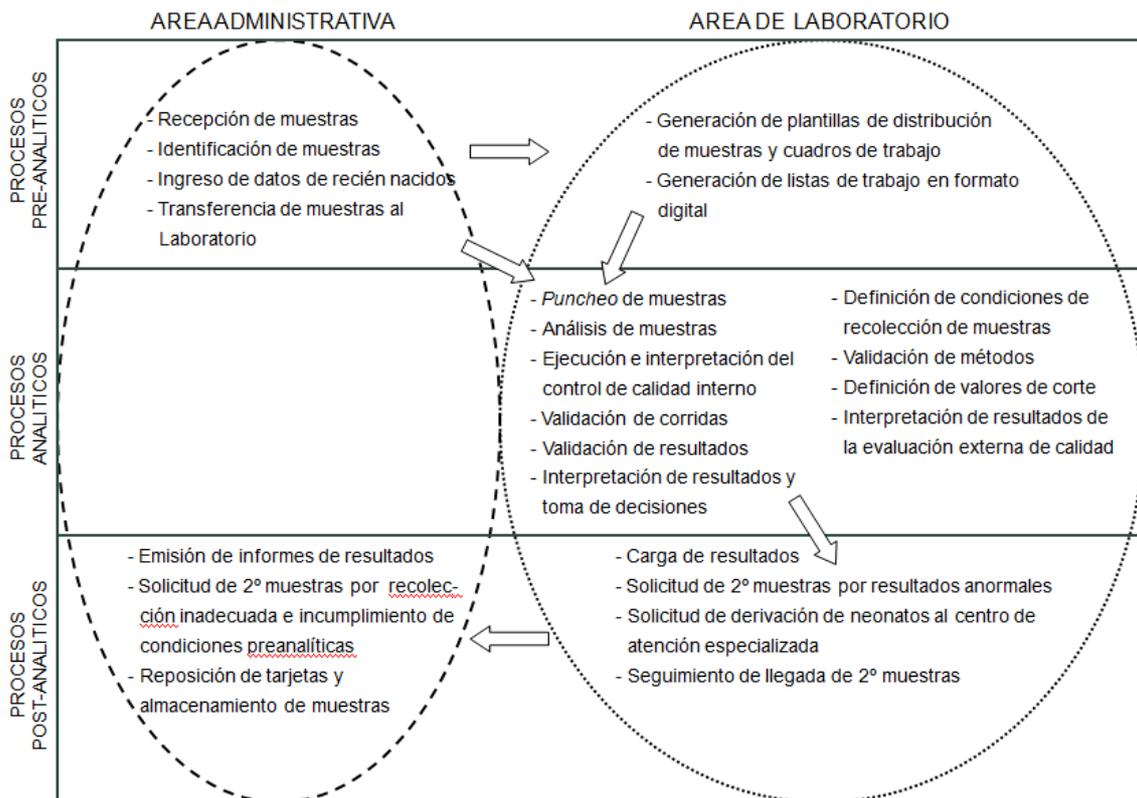


Figura 2. Procesos del laboratorio de Pesquisa Neonatal

Procesos pre-analíticos

En la Tabla 6 se presentan en detalle los principales procesos preanalíticos a considerar en el Laboratorio de pesquisa.

Tabla 6. Procesos preanalíticos

<ul style="list-style-type: none"> ● Recepción de muestras de sangre ● Identificación unívoca de muestras ● Ingreso y manejo de los datos demográficos correspondientes a los recién nacidos ● Ingreso y manejo de los datos correspondientes a laboratorios, hospitales, maternidades y/o clínicas que deriven sus muestras al programa ● Manejo seguro y transferencia sin errores de muestras desde el sector administrativo al área analítica del laboratorio ● Generación de los elementos de control (cuadros, plantillas, esquemas, etc.) y de las listas de trabajo necesarios para el manejo confiable y seguro de las muestras en el área analítica del laboratorio

Idealmente cada uno de estos procesos requiere como condición necesaria disponer de un apropiado Sistema Informatizado de Gestión de Muestras a efectos de simplificar su ejecución y de lograr una máxima eficiencia y confiabilidad, más allá de que en determinadas circunstancias, los mismos puedan ser ejecutados en forma manual.

Por otra parte, y como se puede inferir del esquema presentado en la Figura 2, una parte de estos procesos involucran exclusivamente al personal administrativo, en tanto otros al personal responsable de la ejecución de las tareas de carácter técnico.

Procesos analíticos

Los procesos analíticos abarcan más del 70 % del total de actividades que se desarrollan en el laboratorio de Pesquisa Neonatal, y los mismos pueden dividirse en dos categorías dependiendo de si los mismos son ejecutados diariamente como parte del trabajo de rutina o si son de ejecución periódica, y de acuerdo con estos criterios son presentados en la Tabla 7.

Tabla 7. Procesos analíticos

Procesos de ejecución diaria
<ul style="list-style-type: none"> ● <i>Puncheo</i> de muestras de sangre ● Análisis de muestras ● Ejecución e interpretación de resultados del control de calidad interno ● Validación de corridas analíticas ● Validación de resultados ● Interpretación de resultados y toma de decisiones
Procesos de ejecución periódica
<ul style="list-style-type: none"> ● Definición de condiciones de recolección de muestras ● Validación de métodos analíticos ● Definición y evaluación periódica de valores de corte ● Definición de criterios de interpretación de resultados ● Interpretación de resultados de la evaluación externa de calidad

En el caso de los procesos de ejecución periódica, y considerando que la mayor parte de los mismos serán discutidos en forma pormenorizada en capítulos posteriores, este capítulo centralizará su atención en realizar una descripción detallada de las condiciones de recolección de muestras y de los criterios de definición de valores de corte, con una mínima mención acerca de los métodos de medida y el control de calidad.

1. Muestras de sangre

Si bien la recolección de muestras de sangre es una tarea que corresponde a los procesos preanalíticos del programa de Pesquisa Neonatal, el hecho de que el laboratorio sea precisamente el responsable de definir las condiciones y recomendaciones para dicha recolección determina que, a los fines de su descripción, la discusión sea abordada dentro de los procesos analíticos del laboratorio.

La recolección de muestras es un proceso complejo dado que el mismo involucra múltiples sitios de recolección descentralizados, diversidad de personal en cuanto a formación profesional (enfermeras, médicos, bioquímicos, residentes, técnicos de laboratorio), preparación, capacitación, aptitud y motivación personal, estando sujeto usualmente a un recambio dinámico debido a licencias, enfermedad o jubilación del personal.

Estas características inherentes al propio sistema de Pesquisa Neonatal enfatizan la importancia y necesidad de definir un procedimiento estandarizado para la recolección de muestras y de implementar acciones educativas continuas dirigidas al personal de salud involucrado en la ejecución de estas tareas a fin de asegurar la confiabilidad y óptima calidad de las muestras.

También resulta importante hacer referencia a que toda vez que el laboratorio de pesquisa analiza una muestra de sangre determinada está asumiendo que su calidad es adecuada y se hace responsable de la confiabilidad de los resultados emitidos, razón por la cual el personal encargado de la recolección de muestras debe ser consciente de que existen algunas situaciones de incumplimientos de las condiciones de recolección que dan lugar a muestras no confiables pero que no pueden ser detectadas por el personal de laboratorio sobre la base de sus características macroscópicas (anormalidades silenciosas), pudiendo dar lugar así a la obtención de resultados no confiables.

Tal como ya fuera mencionado en el Capítulo 2, existen normas específicas referidas a las condiciones requeridas para una correcta recolección de muestras de sangre en papel de filtro para programas de Pesquisa Neonatal, publicadas por el Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI) de los EE.UU. (3), en las cuales está basada la descripción que se presenta a continuación:

1.1 Dispositivo para la recolección de muestras de sangre

El dispositivo de recolección de muestras de sangre recomendado para la realización de las pruebas de Pesquisa Neonatal es aquel que fuera ideado por Robert Guthrie en los años '60

(4), basado en la utilización de un papel de filtro de uso diagnóstico en el cual se procede a impregnar las muestras de sangre.

El mismo consta de una sección específica para la recolección de la muestra conformada por el papel de filtro y una sección para el llenado de los datos demográficos del recién nacido.

Este tipo de sistemas de recolección admite trabajar tanto con sangre entera del recién nacido como con sangre de cordón. Sin embargo, y en vista del limitado alcance que poseen las muestras de sangre de cordón, el sistema recomendado y universalmente aceptado, es el que utiliza sangre obtenida del recién nacido por punción del talón impregnada en papel de filtro. En la Tabla 8 se presentan las principales ventajas resultantes del uso de muestras de sangre entera secas impregnadas en papel de filtro para las pruebas de Pesquisa Neonatal.

Tabla 8. Ventajas del uso de muestras de sangre en papel de filtro

- Requerimiento de mínimos volúmenes de sangre
- Estabilidad de los analitos
- Simpleza para el transporte
- Facilidad para el manejo en el laboratorio
- Mínimo riesgo de transmisión de infecciones (bioseguridad)
- Facilidad para el almacenamiento de muestras residuales
- Posibilidad de uso posterior en estudios retrospectivos

1.1.1 Características del papel de filtro. El tipo de papel de filtro que ha de ser utilizado como soporte para la recolección de muestras de sangre de recién nacidos debe cumplir con una serie de especificaciones que, en definitiva, son las que determinarán que el mismo sea apto o no para su uso diagnóstico, razón por la cual dicho papel de filtro no puede ser sustituido por cualquier tipo de papel de filtro de uso corriente en el laboratorio.

Estas especificaciones deben ser respetadas en forma estricta puesto que las mismas inciden en forma directa tanto sobre la calidad final de las muestras como sobre el volumen de sangre absorbido por unidad de área de papel.

En la Tabla 9 se presentan algunas de las especificaciones más importantes que debe cumplir el papel de filtro para que pueda ser considerado como apto para su utilización en pruebas de Pesquisa Neonatal (3).

Tabla 9. Especificaciones del papel de filtro

- Composición de las fibras: 100 % fibras puras de algodón. Libre de aditivos que incrementen su resistencia al ser humedecido.
- Peso: $179 \text{ g/m}^2 \pm 5 \%$
- pH: 5.7 – 7.5
- Contenido de cenizas: menor de 0.1 %.

Por otra parte, también han sido definidas una serie de características de performance (Tabla 10), las cuales deben ser validadas y garantizadas por parte del propio fabricante del papel de filtro previamente a la puesta en circulación de cada lote de producción (3).

Tabla 10. Características de performance del papel de filtro⁵

- Capacidad de absorción:
 - con glóbulos rojos lavados: 1.40 ± 0.20 μ L suero/disco 3.2 mm diámetro
 - con glóbulos rojos no lavados: 1.54 ± 0.17 μ L suero/disco 3.2 mm diámetro
- Homogeneidad
- Diámetro del círculo de la alícuota de sangre impregnada: 16 ± 1 mm
- Tiempo de absorción de la alícuota de sangre: 12 seg (5 – 30 seg)

Resulta importante destacar que, considerando que en las pruebas de Pesquisa Neonatal se establece una correspondencia entre el área de papel de filtro impregnada con sangre y una medida volumétrica, las muestras de sangre deben ser colectadas en el mismo tipo de papel de filtro en el cual están preparados los calibradores del método utilizado, o eventualmente en un tipo y/o lote de papel de filtro que presente una capacidad de absorción equivalente, puesto que diferencias en el mismo pueden conducir a errores sistemáticos (inexactitud) a consecuencia sus diferentes capacidades de absorción.

1.1.2 Información requerida en la tarjeta de recolección de muestras: Existe una batería mínima de datos demográficos que deben ser solicitados a efectos de lograr una correcta identificación tanto del recién nacido y de su madre como del centro asistencial que remitió la muestra de sangre; y una batería adicional de datos que resultan necesarios para poder efectuar una correcta interpretación de los resultados. Dentro de este último grupo se encuentran algunos datos que resultan imprescindibles y que por lo tanto siempre deben estar presentes en el formulario de recolección de muestras, mientras que hay otros que pueden no ser solicitados de rutina en dicho formulario pero que, cuando corresponde, necesariamente deben ser informados por los efectores de recolección de muestras.

En la Tabla 11 se presenta un listado de los principales datos que deben ser incluidos en la tarjeta de recolección (3).

⁵ Las pruebas para determinar las características de performance del papel de filtro se deben realizar trabajando con alícuotas de sangre entera de 100 μ L/mancha, con hematocrito ajustado al 55 % y glóbulos rojos intactos.

Tabla 11. Información requerida en la tarjeta de recolección de muestras

Información del recién nacido
<ul style="list-style-type: none"> ● Nombre y apellido ● Sexo ● Fecha y hora de nacimiento ● Fecha y hora de primera ingesta de leche ● Fecha y hora de toma de muestra ● Peso al nacimiento ● Edad gestacional ● 1º muestra/repeticón
Información de la madre
<ul style="list-style-type: none"> ● Nombre y apellido ● Domicilio ● Localidad ● Teléfono
Información para la interpretación de resultados
<ul style="list-style-type: none"> ● Antecedentes de enfermedades tiroideas maternas y tratamiento ● Tratamiento del bebé con corticoides ● Tratamiento de la madre con corticoides en el último mes de embarazo ● Gemelares monocigóticos (*) ● Administración de dopamina (*) ● Ayunado (*) ● Alimentación parenteral (*) ● Transfusiones o conexión a dispositivos de circulación extracorpórea (*) ● Recién nacido críticamente enfermo (*) ● Ingesta de antibióticos por la mamá o el bebé (*)
Información del centro asistencial que remite la muestra
<ul style="list-style-type: none"> ● Nombre de la Institución y Sector o Departamento ● Nombre del responsable ● Domicilio ● Localidad ● Teléfono

(*) Información que habitualmente no es solicitada de rutina en la tarjeta de recolección

Adicionalmente todas las tarjetas de recolección de muestras deben incluir información acerca del tipo y lote de papel de filtro utilizado, y de la fecha de vencimiento de la misma (5 años a contar a partir de la fecha de su elaboración).

1.2 Tiempos de recolección de muestras

La definición de los tiempos recomendados para la recolección de muestras de sangre por parte de un programa de Pesquisa Neonatal es una tarea que debe realizarse sobre la base del análisis de cuatro elementos esenciales:

- a) cuáles son las enfermedades que forman parte del panel de pesquisa.
- b) cuáles son los analitos que se determinan como parte de las estrategias de detección utilizadas.
- c) cuál es la ventana óptima de detección para cada una de las enfermedades que forman parte del mencionado panel, que va a posibilitar disponer de las mejores oportunidades para el diagnóstico y tratamiento antes de que se expresen los síntomas o de que ocurra un daño permanente.
- d) que las ventanas óptimas de detección de las distintas patologías a pesquisar no necesariamente son coincidentes entre sí y por lo tanto no se superponen temporalmente en forma íntegra, sino que en algunos casos, como por ejemplo en la Galactosemia, Hiperplasia Suprarrenal Congénita y Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce, estas ventanas son extremadamente breves pudiendo aparecer los síntomas hacia el final de la primera semana de vida (5).

Este último hecho determina que, indefectiblemente, se deba establecer una situación de compromiso o equilibrio, de manera tal de lograr que los tiempos de recolección de muestras definidos permitan llevar a cabo la detección de todas las patologías pesquiasadas con el máximo grado de confiabilidad, es decir minimizando al máximo el riesgo de falsos resultados producto de la variabilidad biológica, en el mínimo plazo de tiempo posible, y tomando la menor cantidad de muestras a cada recién nacido, preferentemente una sola.

1.2.1 Tiempos recomendados para la recolección de muestras de sangre. Las recomendaciones para la pesquisa de un panel básico conformado por Fenilcetonuria, Hipotiroidismo Congénito, Fibrosis Quística, Galactosemia (a través de la medida de Galactosa Total), Hiperplasia Suprarrenal Congénita, Deficiencia de Biotinidasa y Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce establecen que la recolección de muestras debe llevarse a cabo después de que el recién nacido haya cumplimentado 24 horas de ingesta de leche conteniendo lactosa -ya sea calostro, leche humana madura o leche maternizada-, y antes de superado el 5º día de vida (5-7).

- **Justificación del tiempo mínimo de recolección:** la condición definida para el tiempo mínimo de recolección de muestras tiene por objetivo minimizar la variabilidad biológica y reducir así a la mínima expresión posible el riesgo de resultados falsos negativos que pueden presentarse en la pesquisa de Galactosemia cuando el recién nacido no ha alcanzado un mínimo de 24 horas de ingesta de leche conteniendo lactosa, y el riesgo de resultados falsos negativos y falsos positivos que pueden presentarse en las pesquisas de Fenilcetonuria (8-10) y Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce (11), y de Hipotiroidi-

dismo Congénito (12) e Hiperplasia Suprarrenal Congénita (13) respectivamente, cuando las muestras se colectan con anterioridad a las 24 horas de vida.

En este punto resulta oportuno mencionar que la exigencia de un mínimo de 24 horas de ingesta de leche previa a la toma de muestra requeridas para la Pesquisa Neonatal de Galactosemia, se debe a que al no existir una fuente endógena de galactosa de una magnitud significativa como para que espontáneamente se pueda poner de manifiesto el defecto metabólico en la sangre de los recién nacidos en las primeras horas de vida, resulta necesario asegurar un aporte exógeno suficiente de la misma a través de la leche o calostro. Por otra parte el riesgo de resultados falsos negativos en la pesquisa de Fenilcetonuria y Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce en muestras colectadas antes de las 24 horas de vida se debe al hecho de que se requiere que transcurran como mínimo 24 horas para que el bloqueo metabólico causante de la enfermedad sea puesto de manifiesto a expensas tanto del aporte exógeno de proteínas recibido a través de la dieta como del aporte endógeno de aminoácidos producto de la condición de hipercatabolismo que se presenta durante las primeras horas de vida y de la consecuente degradación de proteínas tisulares. Y finalmente, el riesgo de resultados falsos positivos en la pesquisas de Hipotiroidismo Congénito e Hiperplasia Suprarrenal Congénita tiene que ver con mecanismos fisiológicos de respuesta accionados por el estrés del parto y la necesidad de termorregulación por parte del propio recién nacido que desencadenan un pico fisiológico de TSH que cae a valores normales a partir de las 12 horas de vida en el primer caso (3), y la movilización transitoria de hormonas adrenales a consecuencia también del estrés del parto en el segundo.

- **Justificación del tiempo máximo de recolección:** la recomendación de un tiempo máximo de recolección de muestras hasta el 5° día de vida tiene por finalidad evitar que el procedimiento de recolección en sí mismo resulte un factor determinante de retraso en el inicio del tratamiento en aquellos casos en los que la patología resulte confirmada. Esta situación adquiere una vital importancia en aquellos recién nacidos afectados por las formas severas de Galactosemia, Hiperplasia Suprarrenal Congénita y Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce a efectos de minimizar el riesgo de expresión de los cuadros clínicos tempranos característicos de estas enfermedades, los cuales pueden causar daño severo e inclusive la muerte de los niños afectados durante las primeras dos semanas de vida (5).

Un aspecto que resulta interesante comentar, es que al efectuar una revisión de los tiempos recomendados para la recolección de muestras que se fueron sucediendo a lo largo de la historia de la Pesquisa Neonatal, se pone de manifiesto que durante el transcurso de la misma se experimentó un proceso continuo de reducción en el tiempo mínimo de recolección, el cual pasó del requerimiento de 96 horas de ingesta de leche previas a la toma de muestras en la década del '80 (14), a las 24 horas de ingesta requeridas actualmente. Este cambio fue impulsado principalmente por el hecho de que las altas en las maternidades han mostrado una tendencia permanente y progresiva a producirse en forma cada vez más precoz a lo largo del tiempo

(7,15,16), dando lugar a que, indefectiblemente, las muestras de sangre deban ser colectadas con anterioridad a los plazos recomendados o a que, eventualmente, los recién nacidos sean dados de alta sin que se haya efectivizado el mencionado procedimiento de recolección.

Más allá de este fenómeno de índole mayoritariamente social y económico, es importante destacar que los sucesivos cambios experimentados en los tiempos recomendados para la recolección de muestras solo pudieron materializarse en la práctica a expensas del surgimiento de métodos con mayor sensibilidad y capacidad para poder discernir claramente dentro de las primeras horas de vida entre aquellos individuos presuntamente afectados y los individuos normales. No obstante esto, es posible presuponer de antemano que existe una limitación operativa en cuanto a futuras posibles reducciones en el tiempo mínimo de recolección de muestras -excepto para aquellas estrategias de pesquisa que puedan surgir a futuro y que utilicen a la biología molecular como método primario de pesquisa (17)-, determinado por el hecho de que por debajo de las 24 horas de vida, y tal como fuera mencionado anteriormente, comienza a ejercer una influencia muy significativa la variabilidad biológica.

- ***Recién nacidos con altas precoces de las maternidades (antes de las 24 horas de ingesta de leche conteniendo lactosa o con anterioridad a las 24 horas de vida):***

independientemente de las recomendaciones definidas anteriormente con respecto a los tiempos mínimos requeridos para la recolección de muestras, se establece que en aquellos casos en los que el niño sea dado de alta antes de cumplir el tiempo mínimo de ingesta de leche requerido, o con anterioridad a las 24 hs de vida, se debe proceder a colectar la muestra igualmente inmediatamente antes del alta sin tener en cuenta su estado alimentario, y programar la recolección de una segunda muestra una vez cumplimentadas las 24 horas de ingesta de leche conteniendo lactosa (6,7).

En estos casos, y a pesar del conocimiento del riesgo potencial de falsos resultados que existe al procesar una muestra colectada en estas condiciones, se indica proceder igualmente a realizar la recolección con la finalidad de que el recién nacido pase a formar parte de los registros del programa, permitiendo así una localización dirigida en caso de que el mismo no acuda espontáneamente al centro asistencial para efectuar la recolección de la segunda muestra (6,7). De esta forma, resulta posible mejorar la cobertura y eficiencia del sistema de pesquisa tal como reflejan de manera contundente los números de la práctica diaria que evidencian que si el recién nacido es dado de alta sin que previamente haya sido colectada la muestra de sangre, y se retira con la indicación de que debe retornar después de haber cumplimentado las 24 horas de ingesta de leche conteniendo lactosa, solo retorna alrededor del 20 % de los mismos, y consecuentemente, el 80 % restante se pierde.

- ***Recién nacidos mayores de 5 días de vida:*** en estos casos no existe un argumento desde el punto de vista del valor diagnóstico de los resultados que impida que la muestra sea recolectada con posterioridad al 5º día de vida, excepto en una situación parti-

cular como es el caso de la Fibrosis Quística. En esta patología se presenta una pérdida del valor diagnóstico de las pruebas cuando las muestras de sangre son colectadas después de los 30 días de vida, debido a que los individuos fibroquísticos sufren una sustitución del tejido pancreático funcional responsable de la producción de Tripsina Inmunorreactiva (IRT) por tejido graso y fibroso, pudiendo presentar en consecuencia niveles normales de IRT que no permiten descartar taxativamente la presencia de la enfermedad. Por este motivo, la recolección de muestras para la Pesquisa Neonatal de Fibrosis Quística debe efectuarse dentro de los plazos generales recomendados, y en caso de que el niño haya sobrepasado el 5° día de vida, la misma debe realizarse indefectiblemente antes de los 30 días de vida a efectos de que el resultado obtenido mantenga su valor diagnóstico (18).

Independientemente de los conceptos anteriores, y más allá de que para la mayor parte de las patologías es posible realizar la pesquisa con muestras colectadas con posterioridad al 5° día de vida, siempre se debe recordar que la definición del tiempo máximo de recolección de muestras responde a razones de eficiencia, puesto que la Pesquisa Neonatal es una carrera contra-reloj en la cual, cuanto más precoz sea el inicio del tratamiento, más efectivo será el mismo.

1.3 Sitios de punción

Dependiendo de las patologías a investigar y de las estrategias de trabajo definidas en cada programa es posible utilizar muestras de sangre obtenidas del recién nacido a partir de diferentes sitios de punción o muestras de sangre de cordón, según se muestra en la Tabla 12.

Más allá de esta observación, se debe destacar que el procedimiento recomendado para la recolección es el que implica la obtención de muestras de sangre del recién nacido por punción el talón y la impregnación directa en el papel de filtro.

Tabla 12. Sitios de punción

<ul style="list-style-type: none"> ● Sangre obtenida del recién nacido <ul style="list-style-type: none"> - Por punción del talón <ul style="list-style-type: none"> ○ Impregnación directa del papel de filtro ○ Recolección en capilares y posterior impregnación. - Por punción venosa <ul style="list-style-type: none"> - De catéter umbilical (venoso o arterial) / femoral ● Sangre de cordón
--

1.3.1 Sangre de obtenida del recién nacido por punción del talón: el procedimiento de obtención de muestras de sangre por punción del talón también ha sido normatizado y descrito en forma detallada por el CLSI en un documento específico referido específicamente a las diferentes técnicas de recolección de muestras de sangre por punción de piel (19). Dicho procedimiento será descrito en detalle en la sección correspondiente a Técnica de Recolección de Muestras.

1.3.2 Sangre obtenida del recién nacido por punción venosa: si bien no existe una contraindicación explícita con respecto al uso de esta fuente alternativa de recolección de muestras, la misma debería limitarse exclusivamente a aquellas situaciones en las cuales exista una necesidad adicional de obtener volúmenes significativos de sangre para la realización simultánea de otro tipo de pruebas de laboratorio. Esta recomendación obedece al hecho de que; por un lado, la punción venosa resulta más invasiva que la punción del talón; y por el otro, a que las venas deberían preservarse para aquellos casos en los que se requiera la administración de líquidos o medicamentos por vía endovenosa (3).

Los sitios recomendados para dicha punción son las venas del dorso de la mano o eventualmente las venas del pliegue del codo, siendo necesario tomar siempre la precaución de que la misma no sea realizada sobre una extremidad en la cual se está o se estuvo infundiendo líquidos o sangre por vía endovenosa.

1.3.3 Sangre obtenida del recién nacido a partir de un catéter umbilical/femoral: exclusivamente en el caso de recién nacidos críticamente enfermos o de muy bajo peso y edad gestacional, es aceptable que la recolección de muestras se realice a partir de un catéter umbilical/femoral venoso o arterial (3). Esta alternativa requiere tomar las precauciones necesarias a fin de evitar una dilución o contaminación de la sangre con otro tipo de líquidos o soluciones.

1.3.4 Sangre de cordón: la sangre de cordón presenta algunas ventajas con respecto a la sangre obtenida del recién nacido como lo es la posibilidad de una rápida obtención, la simpleza del procedimiento de recolección y la disponibilidad de volúmenes significativos. Sin embargo, no resulta ser la fuente de elección para las pruebas de Pesquisa Neonatal debido a que sólo posee valor diagnóstico para la detección de una muy limitada lista de enfermedades congénitas en las cuales la alteración bioquímica investigada ya está presente en la sangre al momento del nacimiento. Éste es el caso por ejemplo del Hipotiroidismo Congénito, de la Galactosemia clásica cuando su pesquisa se realiza dosando la enzima Galactosa-1-fosfato uridil transferasa, de la Deficiencia de Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa o de las Hemoglobinopatías (3). En contraposición, las muestras de sangre de cordón carecen de valor diagnóstico, y por lo tanto no deben ser utilizadas en las pruebas de Pesquisa Neonatal de aquellas patologías que requieren que haya transcurrido un cierto período de tiempo para que se ponga de manifiesto bioquímicamente la acumulación de un metabolito determinado en la sangre del propio recién nacido, situación que se presenta entre otros, en el caso de la Fenilcetonuria, Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce o de la Galactosemia cuando la misma es pesquisada a través de la medida de galactosa total.

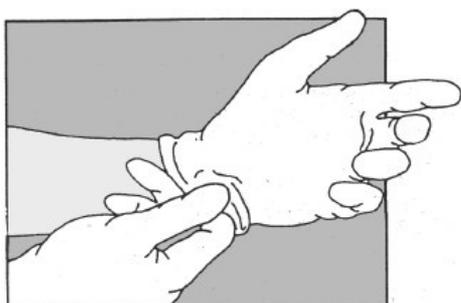
Por otra parte, resulta importante mencionar que aquellos programas de Pesquisa Neonatal que utilizan muestras de sangre de cordón deben hacer frente a algunas dificultades operativas cuando toman la decisión de expandir la lista de enfermedades a investigar a otras que requieren sangre del recién nacido a consecuencia de que, precisamente, la introducción de un cambio en el tipo de muestra de sangre empleado, les exige efectuar una serie de ajustes críticos

en los procedimientos y condiciones de recolección de muestras, y también un re-entrenamiento del personal a cargo de esta tarea.

1.4 Técnica de recolección de muestras de sangre

Considerando que las muestras de sangre obtenidas por punción del talón del recién nacido e impregnadas directamente en el papel de filtro son el tipo de muestras de sangre recomendadas para las pruebas de Pesquisa Neonatal (3), la descripción que se realizará a continuación está enfocada con mayor detalle precisamente en el procedimiento a seguir para la obtención de este último tipo de muestras:

1.4.1 Recolección por punción del talón e impregnación directa del papel de filtro: La técnica de recolección correspondiente a este procedimiento se presenta a continuación en forma detallada, mediante una secuencia gráfica de 8 pasos (Figuras 3 a 10) confeccionada en base a las normas del CLSI (3,19).



1 Se recomienda el uso de guantes para realizar este procedimiento. Evitar el contacto de las áreas circulares del papel con las manos, guantes, soluciones antisépticas, agua u otros materiales ya que pueden afectar la muestra y el diagnóstico.



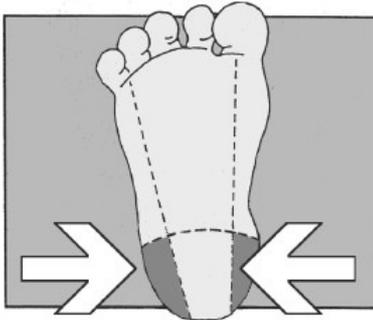
2 Completar los datos solicitados en la tarjeta usando bolígrafo. No usar lapiceras a fuente ni máquinas de escribir. No escribir sobre las áreas circulares. Separar la tapa de la chequera y las copias correspondientes a los padres y hospital o laboratorio.

Figura 3. Técnica de recolección – 1

- Respetar normas de bioseguridad.
- Usar guantes libres de polvo (talco).
- Evitar el contacto de las áreas circulares con manos, guantes, líquidos o superficies.

Figura 4. Técnica de recolección – 2

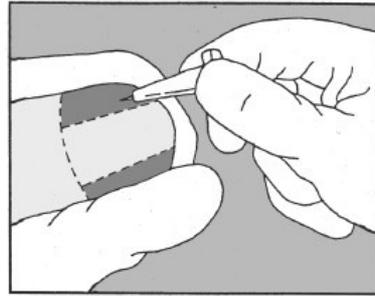
- Confirmar la identidad del recién nacido.
- Completar los datos requeridos en la tarjeta utilizando bolígrafo.



3 Calentar el sitio de punción para aumentar el flujo sanguíneo. Colocar el pie del bebé en una posición tal de modo de incrementar la presión venosa.

Figura 5. Técnica de recolección – 3

- Seleccionar el área de punción.
- Ubicar al recién nacido de forma tal que el pie quede dispuesto por debajo del nivel del cuerpo.
- Calentar el talón a 42 °C por 3 minutos empleando una gasa húmeda y tibia o un dispositivo exotérmico de temperatura controlada.



4 Desinfectar la zona de punción con alcohol 70%. Secar con una gasa estéril. Realizar la punción con una lanceta descartable estéril. Deshechar la primera gota de sangre.

Figura 6. Técnica de recolección – 4

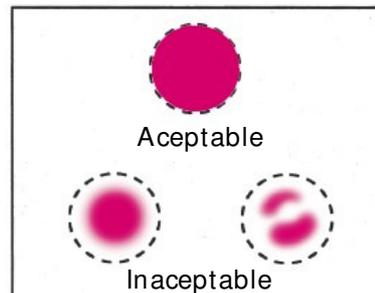
- Desinfectar el talón (isopropanol 70 %) y eliminar el exceso de desinfectante.
- Realizar la punción con una lanceta descartable estéril (< 2,0 mm.).
- Desechar la primera gota de sangre.



5 Colocar una gota de sangre en cada área circular de modo de impregnar completamente el círculo. Ambas caras del papel deben resultar saturadas con la sangre.

Figura 7. Técnica de recolección – 5

- Hacer presión suave e intermitente en el talón (“no ordeñar ni exprimir”).
- Impregnar cada círculo poniendo en contacto el papel de filtro con la gota de sangre formada.
- Colocar una gota de sangre por círculo.
- No superponer gotas de sangre.



6 Cargar todos los círculos requeridos. No colocar sucesivas gotas de sangre en un mismo círculo.

Figura 8. Técnica de recolección – 6

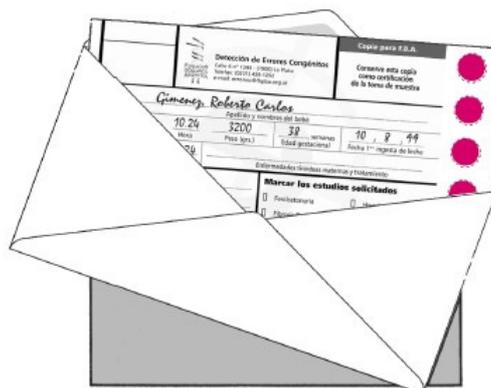
- Verificar que las manchas de sangre en el papel de filtro tengan una calidad apropiada.
- Verificar que la sangre haya saturado ambas caras del papel en todas las manchas.



7 Dejar secar las muestras de sangre al aire durante 3 horas en posición horizontal y elevada, evitando el contacto con superficies, calor directo o luz solar.

Figura 9. Técnica de recolección – 7

- Colocar la tarjeta en posición horizontal en un soporte apropiado.
- No colocar en posición vertical.
- Secar al aire durante 3 horas a temperatura ambiente.
- Evitar el contacto con superficies.
- No exponer al calor o a la luz solar directa.



8 Cuando la muestra está seca, colocar la tarjeta correspondiente a FBA en un sobre. No superponer una muestra con otra. Rotar las tarjetas de modo de alternar las áreas de recolección. Enviar sin demora para su análisis.

Figura 10. Técnica de recolección – 8

- Ubicar las tarjetas para el envío alternando las áreas de recolección.
- No utilizar bolsas de nylon impermeables al aire o con cierre hermético (en tal caso colocar desecantes inertes junto a las muestras).
- No ensobrar muestras húmedas.

1.4.2 Recolección por punción del talón en capilares libres de anticoagulantes: este procedimiento alternativo comparte los primeros 4 pasos de la secuencia gráfica indicada en las Figuras 3 a 6, pero a partir de dicho punto -y a diferencia de la técnica anterior-, se debe proceder a cargar la sangre en capilares libres de anticoagulantes⁶, a razón de un capilar por mancha, evitando la coagulación de la sangre (3).

Una vez culminada la extracción, y habiendo acondicionado previamente el sitio de punción para asegurarse que se interrumpa el sangrado, se debe proceder a impregnar la sangre en el papel de filtro sin demoras, para lo cual el capilar debe apoyarse suavemente en posición vertical en el centro de cada círculo preimpreso, dejando que la sangre fluya libremente por capilaridad hasta que el círculo esté completamente impregnado.

Durante el proceso de impregnación del papel de filtro está absolutamente contraindicado “pintar” el papel de filtro con la sangre desplazando el capilar sobre la superficie del mismo puesto que, cuando el papel de filtro se humedece, se torna sumamente friable, se desprenden fibras y se modifican su textura y espesor dando lugar así a muestras de calidad insatisfactoria.

También está contraindicado realizar aplicaciones “puntiformes” con el capilar puesto que en este caso no sólo se modificará la textura del papel sino que además se correrá el riesgo de

⁶ Si bien la heparina no interfiere en las pruebas de pesquisa basadas en marcadores bioquímicos, el empleo de capilares heparinizados está contraindicado debido a que la misma es un inhibidor de las polimerasas empleadas en la amplificación del material genético, pudiendo causar así interferencias en las pruebas de pesquisa basadas en marcadores moleculares.

que la sangre no llegue a saturar las dos caras del mismo, con lo cual el volumen de sangre impregnado por unidad de área de papel será insuficiente.

1.4.3 Recolección por punción venosa: esta alternativa adicional para la recolección de muestras requiere que la misma sea realizada preferentemente utilizando dispositivos especiales del tipo “*butterfly*”, especialmente cuando la punción se realiza de las venas del dorso de la mano. Estos dispositivos permiten además efectuar la impregnación del papel de filtro directamente desde la guía de dicho dispositivo (3).

Alternativamente, y cuando la punción se efectúa en las venas del pliegue del codo, la extracción puede realizarse con jeringa y aguja, recomendándose en tal caso que para efectuar la impregnación del papel de filtro se quite la aguja de la jeringa y se gotee cuidadosamente desde ésta última en el papel de filtro a efectos de evitar una sobresaturación del mismo.

El empleo de jeringas para la recolección de muestras de sangre para Pesquisa Neonatal introduce un riesgo adicional de coagulación de la sangre y de sedimentación de las células toda vez que la impregnación del papel de filtro no sea realizada rápidamente, dando lugar así a especímenes de mala calidad.

1.4.4 Recolección a partir de un catéter umbilical (arterial o venoso)/femoral: este procedimiento requiere la obtención de la muestra con jeringa desde la guía del catéter, previo purgado de la misma para evitar la dilución o contaminación de la sangre con anticoagulantes, medicamentos o cualquier tipo de líquidos o soluciones que se le estén administrando al recién nacido, procedimiento que sin dudas puede ser una limitación crítica en recién nacidos de muy baja edad gestacional o muy bajo peso.

1.5 Condiciones de secado

Tal como ya fuera mencionado en la Figura 7, el secado de las muestras de sangre debe realizarse durante un tiempo mínimo de 3 horas, colocando las mismas en posición horizontal, a temperatura ambiente, evitando la incidencia de la luz solar o el calor directo y el contacto con cualquier agente externo como superficies o líquidos que pudieran alterar sus propiedades.

Como norma de cumplimiento estricto, el procedimiento de secado de las muestras nunca debe efectuarse en posición vertical (“colgadas”), puesto que en tal caso se pone en juego un efecto cromatográfico desencadenado por acción de la fuerza gravitacional y la resistencia a la difusión de los glóbulos rojos en la matriz del papel de filtro. En términos prácticos, este efecto se traduce en un desplazamiento diferencial del plasma y los glóbulos rojos dentro de cada mancha, dando lugar en definitiva a una muestra de sangre heterogénea caracterizada por presentar un gradiente decreciente de hematocrito entre la posición superior e inferior de cada mancha según el eje vertical en que fuera colocada la muestra para su secado, pero que macroscópicamente resulta indistinguible de una muestra secada en posición correcta.

También es importante mencionar que las muestras nunca deben ser enviadas al laboratorio antes de que haya concluido el proceso de secado, puesto que la humedad es un factor

tanto o más nocivo para la estabilidad de los analitos que la propia exposición al calor, pudiendo alterar así los resultados.

El secado incompleto de las muestras es un fenómeno fácilmente identificable en el laboratorio en base al color rojo intenso de las manchas de sangre, las cuales toman un aspecto de sangre oxigenada. Sin embargo, es importante destacar que este color característico desaparece después de 1 o 2 horas de exposición de la muestra al ambiente, tornándolas así indistinguibles de una muestra correctamente secada. Este hecho amerita que el personal de laboratorio encargado de abrir los sobres que contienen las muestras de sangre registre inmediatamente este hallazgo toda vez que una muestra determinada se presenta con este tipo de características, en concordancia con los procedimientos establecidos en cada laboratorio.

1.6 Condiciones de envío y almacenamiento

1.6.1 Envíos: El procedimiento de envío de muestras de sangre al Laboratorio de pesquisa debe ser realizado en sobres de papel o bolsas de nylon permeables al aire y abiertas, y asegurándose que al colocar las mismas en el interior de dichos sobres se alternen las áreas de recolección a efectos de evitar el contacto entre ellas (las muestras deben rotarse 180° una respecto de la otra).

Las muestras nunca deben ser colocadas en bolsas impermeables y con cierre hermético puesto que al estar impedido el intercambio de aire se produce un aumento de la temperatura y acumulación de humedad en el interior de las bolsas, pudiendo resultar afectada la estabilidad de los analitos (3).

En el caso de que indefectiblemente se requiera el uso de bolsas herméticas, por ejemplo por regulaciones inherentes al sistema de transporte de muestras, entonces necesariamente deberán colocarse desecantes en su interior a fin de evitar que las muestras resulten afectadas.

1.6.2 Almacenamiento: En cuanto al procedimiento de almacenamiento de muestras, el mismo debe realizarse en ambientes secos y frescos, evitando la exposición de las mismas a cualquiera de los factores que ya fueran mencionados anteriormente (calor, luz solar directa, humedad) y que pueden afectar la estabilidad de los analitos.

En el caso de que el almacenamiento se realice en cámara refrigerada a 4 °C, las muestras deben ser colocadas en bolsas de plástico aluminizado de baja permeabilidad al aire, con cierre hermético, y adicionadas de desecantes e indicadores de humedad. En estas últimas condiciones es posible asegurar la integridad de las muestras por períodos de hasta 2 años, en tanto que si se requiere asegurar dicha integridad por períodos de tiempo superiores, entonces se recomienda el almacenamiento a – 20 °C (3).

En cualquiera de las dos condiciones antes mencionadas, siempre se recomienda mantener la humedad por debajo del 30 % a efectos de lograr una mejor conservación de las muestras.

1.7 Situaciones especiales que requieren un doble muestreo:

Por último, y a pesar de que la obtención de resultados confiables en las pruebas de pesquisa es función de que la recolección de muestras se realice respetando los tiempos óptimos recomendados, existen además una serie de situaciones especiales relacionadas con las condiciones preanalíticas del recién nacido, de su mamá, o de tratamientos que pueden estar recibiendo uno, otro o ambos, que le hacen perder valor diagnóstico a los resultados de algunas pruebas y que determinan la necesidad de proceder a la recolección de una segunda muestra, procedimiento que se deberá ejecutar recién una vez revertida la condición que da lugar a la pérdida de confiabilidad de los resultados, hecho que ocurrirá en un plazo de tiempo variable dependiendo de cada situación en particular:

- **Recién nacidos pretérmino de menos de 32 semanas de edad gestacional:** coleccionar una segunda muestra a los 21 días de vida, o una vez que el niño haya alcanzado una edad correspondiente a la edad gestacional de un niño nacido a término, con la finalidad de evitar potenciales falsos negativos en la pesquisa de Hipotiroidismo Congénito ocasionados por la inmadurez del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (20,21).
- **Mellizos monocigóticos:** coleccionar una segunda muestra a los 14 días de vida con la finalidad de evitar potenciales falsos negativos en la pesquisa de Hipotiroidismo Congénito debido a la compensación intrauterina en los niveles de hormonas tiroideas que puede producirse en aquellos casos en los cuales uno de los gemelares es hipotiroideo y el otro es normal (21,22).
- **Recién nacidos tratados con corticoides:** coleccionar una segunda muestra 2 semanas después de suspendida la administración del fármaco a efectos de evitar potenciales falsos negativos en las pesquisas de Hipotiroidismo Congénito e Hiperplasia Suprarrenal Congénita que podrían producirse a consecuencia de la acción supresora de los corticoides tanto sobre la liberación de TSH como sobre la secreción de hormonas tiroideas y de 17OH-Progesterona (5,21,22).
- **Recién nacidos cuyas madres recibieron tratamiento con corticoides en el último mes del embarazo:** coleccionar una segunda muestra a los 14 días de vida, a efectos de evitar falsos negativos en las pesquisas de Hipotiroidismo Congénito e Hiperplasia Suprarrenal Congénita ocasionados por la acción supresora de los corticoides sobre la liberación de TSH y sobre la secreción de hormonas tiroideas y de 17OH-Progesterona (5).
- **Recién nacidos recibiendo tratamiento con dopamina:** coleccionar una segunda muestra una vez suspendida la administración del fármaco, con la finalidad de evitar resultados falsos negativos en la pesquisa de Hipotiroidismo Congénito debido al efecto inhibitorio de la dopamina sobre la liberación de TSH (5, 20-22).
- **Recién nacidos ayunados:** coleccionar una segunda muestra una vez cumplimentadas las 24 horas de ingesta de leche conteniendo lactosa, a efectos de evitar potenciales falsos negativos en las pesquisas de Fenilcetonuria, Galactosemia y Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce (5).

- **Recién nacidos recibiendo nutrición parenteral total:** coleccionar una segunda muestra al menos 4 horas después de suspender la nutrición parenteral total a efectos de descartar potenciales falsos positivos en las pesquisas de Fenilcetonuria y Enfermedad de Orina Jarabe de Arce (5, 23).
- **Recién nacidos transfundidos o conectados a dispositivos de circulación extracorpórea⁷:** en estos casos se recomienda recolectar la muestra inicial según las recomendaciones generales antes de realizar cualquiera de estos dos procedimientos. Independientemente de esto, y en caso de que la recolección no se haya podido realizar de esta forma, se debe proceder a coleccionar una segunda muestra 72 horas después de haber concluido el procedimiento, a efectos de evitar potenciales falsos negativos en cualquiera de las 7 patologías del panel básico a consecuencia tanto del efecto dilucional y/o de lavado de la sangre, como del reemplazo de volumen producido por los procedimientos anteriores (5).
Es importante mencionar que en aquellas estrategias de pesquisa que se basan en la medida de un analito localizado exclusivamente dentro de los glóbulos rojos como es el caso de la enzima Galactosa-1-fosfato uridil transferasa para la pesquisa de Galactosemia, o en la determinación de Hemoglobinas para la detección de Hemoglobinopatías, las pruebas quedan invalidadas durante un plazo de tiempo equivalente a la vida media de los glóbulos rojos del donante.
- **Recién nacidos críticamente enfermos:** coleccionar una segunda muestra una vez que el niño haya superado su estado crítico de salud, a efectos de descartar disminuciones transitorias de T₄ y aumentos de TSH que habitualmente se presentan asociados a enfermedades no tiroideas (21,22).

En relación a la recolección de segundas muestras, y a efectos de mejorar la eficiencia del sistema de seguimiento del programa de Pesquisa Neonatal, se recomienda que todos los procedimientos de recolección de segundas muestras que se deban llevar a cabo, sean programados en cada maternidad con anterioridad a recibir su solicitud desde el laboratorio de pesquisa.

1.8 Muestras satisfactorias y muestras insatisfactorias

Como corolario a las condiciones y recomendaciones antes descriptas para la recolección de muestras de sangre para las pruebas de Pesquisa Neonatal, se debe mencionar que cada Programa debe tener claramente establecido y sin dejar lugar a ningún tipo de ambigüedades o de interpretaciones equívocas, que se entiende por muestra satisfactoria, adecuada, apropiada, válida o correctamente coleccionada.

Básicamente, con esta sinonimia o terminología equivalente se denomina a aquellas muestras que cumplen las siguientes condiciones:

⁷ Los dispositivos de circulación extracorpórea son empleados en el tratamiento de niños afectados con una amplia variedad de condiciones tales como sepsis, neumonía, hernia diafragmática y aspiración de meconio, a fin de aportar circulación y oxigenación de la sangre, permitiendo al corazón y pulmones recuperarse de la injuria o inmadurez.

- a) El llenado completo de toda la información solicitada en la tarjeta de recolección de muestras.
- b) La óptima calidad de impregnación de la sangre en el papel de filtro tanto cualitativa (características macroscópicas de la manchas) como cuantitativamente (volumen de sangre por mancha), poniendo un especial énfasis en que cada círculo preimpreso en el papel de filtro haya sido impregnado completamente a partir de una única gota de sangre, saturando igualmente ambas caras del papel, y que además el procedimiento de secado y posterior transporte de las muestras al laboratorio haya sido realizado en condiciones apropiadas.
- c) El cumplimiento de todas las condiciones preanalíticas requeridas del recién nacido.

Este hecho resulta de vital importancia para asegurar la eficiencia del programa de Pesquisa Neonatal por la sencilla razón de que la calidad del resultado de un análisis nunca puede ser superior a la calidad de la muestra analizada, aún en aquellas condiciones de trabajo en las que se cuente con tecnología de última generación, altamente automatizada y sometida a estrictos controles de calidad internos y externos, por lo cual si la muestra obtenida del recién nacido es de mala calidad e igualmente se procede a procesarla, indefectiblemente el resultado será de mala calidad.

Estas observaciones, que a priori pueden resultar casi una obviedad, tienen implicancias de un valor muy significativo puesto que una recolección inadecuada de muestras puede dar lugar al retraso en la detección e inicio del tratamiento de casos positivos, a una potencial pérdida de casos, a la generación de un trauma innecesario al recién nacido, a desencadenar una innecesaria carga de angustia y ansiedad en los padres, y a ocasionar una sobrecarga de trabajo en el sistema de pesquisa en su conjunto (3). Por este motivo, resulta fundamental que el personal responsable de llevar a cabo la recolección de muestras esté capacitado como para poder discernir en qué casos la impregnación de la sangre en el papel de filtro ha sido correcta y en qué casos no, de manera tal de proceder a la toma de una nueva muestra de calidad satisfactoria inmediatamente antes de enviar la misma, evitando así que sea el laboratorio de pesquisa quien deba notificar que corresponde la recolección de una segunda muestra.

2. Métodos de medida

De manera similar a lo que acontece en el caso de las pruebas analíticas utilizadas en los laboratorios generales de análisis clínicos, los métodos empleados para las pruebas Pesquisa Neonatal deben cumplir con una serie de exigencias analíticas y diagnósticas que les permitan garantizar la obtención de resultados confiables y seguros.

Sin embargo, el nivel de exigencia impuesto en el caso de las pruebas de pesquisa resulta ser mayor aún dado que las implicancias de un resultado erróneo, y en particular de un resultado falso negativo, darán lugar indefectiblemente a que un individuo afectado con alguna de estas enfermedades padezca una discapacidad física o neurológica de por vida o, eventualmente, a que muera en el período neonatal o durante su infancia temprana.

Una revisión de lo ocurrido a lo largo de la historia de la Pesquisa Neonatal pone en evidencia que los métodos utilizados han evolucionado en sincronía con los avances tecnológicos

puestos de manifiesto en las ciencias en general. Este hecho, ha determinado entre otras cosas que desde hace ya más de 10 años se evidencie una tendencia bien definida a sustituir las pruebas clásicas basadas en la realización de un test para detectar una patología determinada, por pruebas basadas en plataformas de tipo multiplex, en las cuales a partir de una única prueba es posible detectar múltiples patologías.

A efectos de ejemplificar dicha evolución, en la Tabla 13 se presenta una lista de las diferentes metodologías o principios analíticos empleados en la Pesquisa Neonatal, ordenados según un orden cronológico aproximado de aparición de las mismas.

Tabla 13. Principios analíticos empleados en Pesquisa Neonatal

- | |
|---|
| <ul style="list-style-type: none"> ● Ensayos de Inhibición Bacteriana (BIA) ● Cromatografía en capa fina (TLC) ● Métodos Fluorométricos ● Radioinmunoensayos (RIA) ● Inmunoensayos no isotópicos <ul style="list-style-type: none"> - Enzimo inmunoensayos (EIA) - Inmunoensayos Fluorométricos (FEIA) - Fluorimetría a Tiempo Resuelto (DELFI) ● Métodos Colorimétricos ● Métodos Enzimáticos Colorimétricos ● Métodos Enzimáticos Fluorométricos ● Espectrometría de Masa en Tándem (MS/MS) ● Perfil de Múltiples Analitos (Luminex™) |
|---|

2.1 Criterios de selección de Métodos

La selección de los métodos a utilizar en las pruebas de Pesquisa Neonatal también resulta ser un paso crítico, y el procedimiento a seguir para tal fin deberá estar basado en al menos 5 aspectos:

- a) El profundo conocimiento de la especificidad y la sensibilidad analítica y diagnóstica de los métodos en cuestión, parámetros que deben ser conocidos previamente a la implementación de los mismos en rutina.
- b) Los costos de los mismos, de forma tal de poder acceder a métodos lo más económicos posible, pero siempre teniendo en cuenta que el costo no puede ser el único criterio de selección utilizado, y por lo tanto ese costo debe ir acompañado de condiciones de performance analítica y diagnóstica acordes a las exigencias establecidas.
- c) El expertise del personal de laboratorio requerido en cuanto al manejo tanto de los principios analíticos a seleccionar como del instrumental que eventualmente pueda ser necesario para la realización de las pruebas.

En general, cuando se habla de pruebas clásicas las mismas tienen una baja complejidad y por lo tanto no se necesita un nivel profundo de capacitación y entrenamiento,

pero en cambio, cuando se habla de otras metodologías de mayor complejidad como puede ser la espectrometría de masa en tandem o las técnicas moleculares, indefectiblemente se requiere una capacitación y entrenamiento previo del personal.

- d) La infraestructura del laboratorio en cuanto a la disponibilidad y características de equipamientos previamente instalados que puedan aplicarse a la realización de las pruebas.
- e) La potencial posibilidad de automatización de los métodos seleccionados.

3. Valores de corte

Los valores de corte constituyen una de las variables que mayor influencia ejerce sobre la exactitud diagnóstica del sistema de Pesquisa Neonatal, razón por la cual resulta imprescindible que la definición de los mismos sea llevada a cabo a través de la ejecución de estudios poblacionales, sobre la propia población de recién nacidos sobre la cual uno va a trabajar, y sobre la base de una serie de criterios previamente establecidos.

Esta modalidad racional de trabajo permitirá establecer valores de corte apropiados y consecuentemente llevar a cabo una correcta identificación tanto de los individuos afectados como de los individuos normales.

En contraposición con esta aseveración, una inapropiada definición de los mismos podrá afectar de manera crítica y determinante tanto la sensibilidad como la especificidad diagnóstica del sistema y, en definitiva, la eficacia del mismo.

3.1 Criterios de definición de valores de corte

3.1.1 Distribuciones normales o Gaussianas de individuos sanos. En aquellos casos en los que la distribución de los individuos sanos sea de tipo normal o Gaussiana, el criterio recomendado para la definición del valor de corte es $X \pm 2DS$, donde X es la media de la distribución y DS su desvío estándar. Empleando este criterio queda determinado que el 95.5 % de la población de individuos sanos presentará resultados normales y el 4.5 % resultado anormales. Este criterio es el más frecuentemente utilizado en Química Clínica. Sin embargo, en Pesquisa Neonatal se utiliza en muy baja proporción porque en la mayor parte de los casos las distribuciones de recién nacidos sanos no se ajustan a curvas de tipo Gaussianas.

Sumado a esto, debe tomarse en consideración que los resultados anormales en las pruebas de Pesquisa Neonatal vienen determinados, en general, por valores aumentados o por valores disminuidos del analito en cuestión, pero muy rara vez por ambas situaciones en forma simultánea. En razón de esto, el valor de corte debe ser fijado exclusivamente sobre una de las colas de la distribución según sea que la detección de los individuos afectados se realice midiendo la acumulación o la deficiencia de un analito determinado, siendo este un concepto que a su vez, puede extrapolarse también a distribuciones no normales.

3.1.2 Distribuciones no Gaussianas de individuos sanos: En aquellos casos en los que la distribución de los individuos sanos sea no Gaussiana, el valor de corte deberá establecerse

mediante la definición de un percentilo seleccionado arbitrariamente (25,26), tomando en consideración para esto 2 factores críticos:

- a) el grado de superposición o solapamiento esperado entre las distribuciones de individuos normales y de individuos afectados.
- b) la situación de compromiso buscada entre sensibilidad y especificidad del sistema de detección, de manera tal de poder asegurar que los falsos negativos sean minimizados a un valor lo más próximo a cero posible, pero con una tasa de falsos positivos que se encuentre dentro de límites aceptables, que sea manejable, y que no genere una excesiva sobrecarga de trabajo en la instancia de seguimiento del Programa.

Esto significa que, utilizando este criterio y según sea el percentilo seleccionado, quedará definido de antemano el porcentaje de la población normal que presentará resultados anormales, o en otros términos el porcentaje de falsos positivos que presentará la estrategia de detección de una patología determinada.

A efectos de ejemplificar este concepto, si se define el valor de corte en el percentilo 99.5 %, esto significa que la tasa de falsos positivos será del 0.5 %.

Este criterio de definición de valores de corte empleando un percentilo determinado es el más frecuentemente utilizado en la pruebas de Pesquisa Neonatal.

Como dato orientador, es recomendable que el porcentaje de falsos positivos en un programa de Pesquisa Neonatal sea siempre inferior al 1.0 %, con valores aceptables del orden del 0.3 al 0.5 % y valores óptimos del 0.10 y 0.15 % o menores.

Esta afirmación pone en evidencia que el criterio de la $X \pm 2DS$ descripto para el caso de distribuciones normales excede largamente la tasa recomendada de falsos positivos para la Pesquisa Neonatal, por lo cual en el caso de distribuciones normales también resulta apropiado definir el valor de corte empleando una fórmula similar a la descripta anteriormente pero en la cual el factor que multiplica al DS sea de mayor magnitud (por ejemplo: $X \pm 3DS$), o a través de la definición de un percentilo determinado en forma similar a lo descripto para distribuciones no Gaussianas (25,26).

3.1.3 Distribución de individuos afectados: En condiciones ideales, el procedimiento a seguir para una óptima definición de los valores de corte en el sentido estricto de la palabra requeriría trabajar no solamente con los datos de la distribución correspondiente a los individuos normales, sino también con los correspondientes a la distribución de los individuos afectados.

Este último hecho constituye una limitación práctica muy importante puesto que la prevalencia de estas enfermedades es usualmente muy baja y por lo tanto es casi imposible reunir una cantidad de datos estadísticamente significativa en un período de tiempo razonable, como para permitir efectuar una evaluación poblacional que sea representativa de la realidad.

En general, ningún programa de Pesquisa Neonatal en forma aislada cuenta con datos suficientes como para poder definir esta distribución de manera confiable, motivo por el cual la única alternativa posible para concretar este objetivo es a través de estudios colaborativos multicéntricos (27). No obstante esto, debe destacarse que dicha modalidad de trabajo sólo será

válida y satisfactoria siempre y cuando los resultados obtenidos al momento de analizar cada muestra en los distintos centros involucrados en el mencionado estudio colaborativo sean comparables, es decir cuando, en promedio, cada uno de ellos les asigne un valor similar (28).

3.1.4 Premisas para la definición de valores de corte

- Los valores de corte siempre deben ser establecidos previamente a la implementación de la pesquisa mediante un estudio poblacional realizado en prueba piloto sobre una población de al menos 500 recién nacidos.
- Los valores de corte proporcionados en los insertos de los kits comerciales deben ser utilizados con precaución puesto que, en general, los mismos son establecidos sobre poblaciones muy reducidas de recién nacidos (del orden de 200 o menos), y cuya composición étnica puede distar diametralmente de la población target a la cual estará dirigida la pesquisa (25).
- Los valores de corte proporcionados por la bibliografía deben ser utilizados sólo como orientación y referencia. Por otra parte, y al igual que en el caso de los valores de corte proporcionados por los kits comerciales, se deberá prestar especial atención al hecho de que dichos valores de corte pueden haber sido definidos sobre una población con una composición étnica absolutamente diferente de la que se está pesquisando o pretendiendo pesquisar (25).
- Adicionalmente, una alternativa válida que habilita a la utilización de valores de corte bibliográficos, valores de corte proporcionados por los fabricantes de reactivos o valores de corte obtenidos en otros centros de pesquisa, evitando así la necesidad de definirlos en el propio laboratorio, es realizar una validación de los mismos empleando para ello protocolos de transferencia confeccionados específicamente para tal fin (25). Sin embargo, debe quedar en claro que estos protocolos no han sido diseñados pensando en pruebas de Pesquisa Neonatal y que en principio no parecen ser fácilmente extrapolables a las mismas.
- Los valores de corte a utilizar cuando se comienza con una pesquisa determinada deben ser valores de corte conservadores, debiendo mantenerse sin cambios a lo largo del tiempo hasta tanto se amplíe el número de neonatos evaluados y los mismos puedan ser redefinidos sobre una población de recién nacidos que resulte estadísticamente más significativa, aún sabiendo que estos valores de corte conservadores van a generar una tasa de falsos positivos más alta que la que se debería esperar hasta tanto sea posible adquirir mayor experiencia.
- Los valores de corte deben ser redefinidos o recalculados periódicamente a través de nuevos estudios poblacionales, muy especialmente toda vez que se introduce una modificación en los métodos de análisis, a medida que va aumentando el número de recién nacidos pesquisados, y con una mayor o menor frecuencia dependiendo de la complejidad de cada patología.
- Los valores de corte podrán definirse siguiendo distintas modalidades según los análisis que se estén evaluando y las características analíticas y diagnósticas de los méto-

dos de medida utilizados. De esta forma podrán definirse valor de corte fijos - invariables corrida a corrida- como los utilizados por ejemplo en la medida de fenilalanina o TSH; o valor de corte fluctuantes -establecidos para cada corrida en forma particular utilizando un percentilo definido previamente- como los empleados en algunos programas en la medida de IRT o T₄ (29).

- Por otra parte, y dependiendo de la influencia ejercida por determinadas variables biológicas sobre los valores de referencia de ciertos analitos, como son por ejemplo la edad del recién nacido al momento de la toma de muestras, la edad gestacional o el peso al nacimiento, podrán seleccionarse valores de corte independientes de dichas variables -como los utilizados por ejemplo en las medidas de fenilalanina o TSH- o valor de corte ajustados según algunas de esas variables -como por ejemplo los utilizados en la medida de 17OH-Progesterona.

4. Control de Calidad

El Control de Calidad es otro de los pilares sobre los cuales debe sustentarse el Laboratorio de Pesquisa Neonatal, puesto que a través de la implementación de un apropiado sistema de control de calidad será posible llevar a cabo, por un lado, el monitoreo permanente del desempeño analítico de los métodos en uso y de los diferentes procedimientos que se ejecutan dentro del Laboratorio, y por el otro, la ejecución de todas las acciones correctivas que corresponda realizar antes de que la performance de dichos métodos resulte afectada.

Básicamente, el control de calidad en el Laboratorio de pesquisa puede dividirse en 3 áreas, las cuales serán descritas en detalle en los Capítulos 6 y 7:

- a) Implementación sistemática de un estricto Sistema de Control de Calidad Interno.
- b) Participación en al menos un Programa de Evaluación Externa de Calidad para cada uno de los analitos evaluados, y preferentemente en dos.
- c) Implementación de un Sistema Integral de Control de Calidad en todos los procesos que se llevan a cabo como parte del programa, es decir que involucre también tanto a los procesos preanalíticos como a los post-analíticos.

Procesos post-analíticos

Con respecto a los procesos post-analíticos, y al igual que lo que acontece en el caso de los procesos preanalíticos, los mismos requieren idealmente y como condición necesaria disponer de un apropiado Sistema Informatizado de Gestión de Muestras a fin de lograr el manejo efectivo, seguro y confiable de los resultados, más allá de que en determinadas circunstancias los mismos podrían ser ejecutados en forma manual. En la Tabla 14 se presenta un listado de los principales procesos Post-analíticos a considerar en el Laboratorio de pesquisa.

Tabla 14. Procesos post-analíticos

- Carga de resultados
- Emisión y envío de informes de resultados
- Comunicación de solicitudes de 2º muestras
 - Por calidad inadecuada de la muestra
 - Por incumplimiento de condiciones preanalíticas
 - Por resultados anormales (resultados dudosos)
- Comunicación de solicitudes de derivación de RN al centro de atención especializada (resultados patológicos)
- Seguimiento de llegada de 2º muestras solicitadas
- Seguimiento de concurrencia de neonatos derivados
- Reposición de tarjetas de recolección de muestras
- Apropiado archivado de datos, resultados y documentación de valor legal del Programa
- Apropiado almacenamiento de muestras de sangre residuales

Referencias

1. Therrell BL, Panny SR, Davidson A, Eckman J, Hannon WH, Henson MA, Hillard M, Kling S, Levy HL, Meaney FJ, McCabe ERB, Mordaunt V, Pass K, Shapira E and Tuerck J. “U.S. Newborn Screening System Guidelines: Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services”. *Screening* 1, 135-47, 1992.
2. Borrajo GJC, “Pesquisa Neonatal de Enfermedades Congénitas”, Tesis Doctoral, <https://doi.org/10.35537/10915/42046>, 2011.
3. CLSI. “Blood Collection on Filter Paper for Neonatal Screening Programs”. Approved Standard – Sixth Edition. CLSI Document NBS01-A6, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
4. Guthrie R and Susi A. “A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants”. *Pediatrics* 32, 338-43, 1963.
5. CLSI. *Newborn Screening for Preterm, Low Birth Weight, and Sick Newborns*. 2nd ed. CLSI guideline NBS03. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2019.
6. Committee on Genetics – American Academy of Pediatrics; “Issues in Newborn Screening”. *Pediatrics*, 89, 345-349, 1992.
7. Pass KA, Levy HL. “Statement of the Conference” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, xiii-xvii, 1995.
8. Jew K, Kan K, Koch R, Cunningham GC. “Validity of Screening Early Collected Newborn Specimens for Phenylketonuria Using a Fluorometric Method”. *Screening* 3, 1-9, 1994.

9. Jew K. “PKU – Review of Clinical Development & Newborn Screening Aspects” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, 113-25, 1995.
10. Levy HL. “Is Early Discharge a Problem for Newborn Screening?” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, 23-30, 1995.
11. Naylor EW. “Impact of Early Hospital Discharge on Newborn Screening for Homocistinuria and Maple Syrup Urine Disease” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, 126-32, 1995.
12. Foley TP, Torresani TE. “Congenital Hypothyroidism” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, 133-54, 1995.
13. Gonzalez JL. “Newborn Screening for Congenital Adrenal Hyperplasia: The Texas Experience” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, 155-66, 1995.
14. Bickel H. “Rationale of Neonatal Screening in Inborn Errors of Metabolism” en “Neonatal Screening for Inborn Errors of Metabolism”. Bickel H, Guthrie R and Hammersen G Eds, Springer-Verlag, Berlin-Heidelberg-New York, 1-6, 1980.
15. Pass K. “Introduction and Conference Overview” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, 8-22, 1995.
16. Cunningham GC, Lorey F, Arnopp J, Patterson M, Currier R. “Early Discharge Trends and their Effect on Fenilcetonuria Screening” en “Early Hospital Discharge: Impact on Newborn Screening”. Pass KA and Levy HL Eds, CORN-Emory University School of Medicine, Atlanta, 31-56, 1995.
17. Duane A and van Dyck PC. “A Vision of the Future of Newborn Screening”. *Pediatrics* 117, S350-S354, 2006.
18. Borrajo GJC. “Pesquisa Neonatal” en “Fibrosis Quística”. Segal E, Fernández A y Rentería F Editores. 1ª Edición. Editorial Journal. Buenos Aires, 63-77, Cap. 15, 2003.
19. CLSI. “Procedures and Devices for the Collection of Diagnostic Capillary Blood Specimens”; Approved Standard—Sixth Edition. CLSI document GP42-A6. Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2008.
20. Comité de Endocrinología. Sociedad Argentina de Pediatría. Recomendaciones para los Programas de Pesquisa Neonatal de Hipotiroidismo Congénito. *Arch Argent Pediatr* 98, 244-6, 2000.
21. Borrajo G, Fideleff G, Herzovich V, Testa G. “Hipotiroidismo Congénito: Pesquisa, Confirmación y Seguimiento”. Tercer Consenso Argentino Sobre Patologías Endocrinológicas. *Rev Argent Endocrinol Metab* 46, 50-4, 2009.

22. American Academy of Pediatrics, Susan Rose, and the Section on Endocrinology and Committee on Genetics, American Thyroid Association, Rosalind Brown, and the Public Health Committee and Lawson Wilkins Pediatric Endocrine Society. "Update of Newborn Screening and Therapy for Congenital Hypothyroidism". *Pediatr* 117, 2290-2303, 2006.
23. Morris F, Fischer K, Leydeker K et al, "Reduction in Newborn Screening Metabolic False-Positive Results Following a New Collection Protocol", *Genet Med*, 16(6), 477-483, 2014.
24. Chace D, Spitzer A, De Jesús V, "Applications of Dried Blood Spots in Newborn and Metabolic Screening" en "Dried Blood Spots: Applications and Techniques" Li W and Lee M Eds. First ed. JohnWiley & Sons, Inc., Chapter 6, 2014.
25. NCCLS. "How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory"; Approved Guideline—Second Edition. NCCLS document C28-A2, Vol 20 N° 13, 2000.
26. Solberg HE. "Approved Recommendations (1987) on the Theory of Reference Values. Part 5. Statistical Treatment of Collected Reference Values. Determination of Reference Limits". *J Clin Chem Clin Biochem* 25, 645-56, 1987.
27. McHugh DM, Cameron CA, Zakowicz WM et al, "Clinical Validation of Cutoff Target Ranges in Newborn Screening of Metabolic Disorders by Tandem Mass Spectrometry: A Worldwide Collaborative Project", *Genetics in Medicine*, 13, 230–254, 2011.
28. Cuckle HS and Wald N. "Tests Using Single Markers" en "Antenatal and Neonatal Screening". Wald N and Leck I Eds, Second Edition, Oxford University Press, Oxford-New York, 1-22, 2000.
29. Slazyk WE and Hannon WH. "Quality Assurance in the Newborn Screening Laboratory" en "Laboratory Methods for Neonatal Screening", Therrell BL Ed, American Public Health Association, Washington, 23-46, 1993.

CAPÍTULO 4

Automatización

Definición y objetivos

Técnicamente hablando, la automatización consiste en la aplicación de la computarización, información, robótica, electrónica y tecnologías de la ingeniería mecánica a los problemas del laboratorio (1).

Desde el punto de vista de sus objetivos la automatización se puede definir como un proceso cuya finalidad consiste en incrementar la eficiencia y el rendimiento del Laboratorio con una concomitante simplificación operativa y disminución de errores humanos, tiempos de operación y costos, a través de la estandarización y optimización de las diferentes tareas que se llevan a cabo en el mismo.

El diseño de un sistema automatizado de trabajo requiere como condiciones necesarias el acceso a la informatización y la disponibilidad del equipamiento de laboratorio específico requerido para automatizar las diferentes tareas que le competen, incluyendo entre éstas tanto a los procesos analíticos como a los pre y post-analíticos (2).

Beneficios generales de la automatización

- Asistir al personal del laboratorio en la realización de tareas repetitivas.
- Lograr un mayor aprovechamiento de los recursos humanos a partir de una reducción del tiempo/hombre de análisis, incrementando concomitantemente la capacidad de trabajo y permitiendo al personal involucrarse en tareas que están más allá de lo que implica la resolución de la rutina diaria.
- Reducir costos.
- Mejorar la calidad de los datos y la reproducibilidad de los resultados a través de la estandarización de procesos.
- Disminuir errores.
- Proveer mejores herramientas para llevar a cabo el trabajo del laboratorio.
- Simplificar el manejo de datos e información.

- Optimizar los distintos sistemas de seguimiento que se requieren como parte de las tareas de laboratorio.
- Ofrecer mejores prestaciones para los “clientes” del laboratorio en cuanto a la accesibilidad a los resultados y al tiempo requerido para la disponibilidad de los mismos.

Procesos a automatizar

Procesos preanalíticos

Objetivos

- Minimizar o eliminar los errores que más frecuentemente se presentan en las tareas que forman parte de los procesos preanalíticos, fundamentalmente aquellos relacionados con el ingreso de datos al Sistema Informatizado de Gestión de Muestras.
- Simplificar aquellos procesos administrativos que, de alguna manera, pueden dificultar la interconexión fluida y dinámica entre el área administrativa y el área de laboratorio.

Elementos requeridos para la automatización de procesos preanalíticos

- Tarjeta de recolección de muestras diseñada bajo normas estándar, que incluya una numeración preimpresa con códigos de barras (3).
- Códigos de barras para identificación del remitente.
- Sistema de doble numeración:
 - Numeración preimpresa: se trata de un elemento de identificación unívoca propia de cada recién nacido y propio de cada tarjeta de recolección de muestras, que permite simplificar y asegurar el flujo de información entre el laboratorio de pesquisa y los centros asistenciales que remiten las muestras de sangre.
 - Numeración diaria: se trata de una numeración de uso interno del laboratorio, que se conforma sobre la base de la estructura AAMMDDXXXX, donde AA corresponde a los 2 últimos dígitos del año en curso, MM corresponde al mes, DD corresponde al día, y XXXX corresponde a la secuencia correlativa de numeración de las muestras de acuerdo al orden de ingreso al Laboratorio, comenzando cada día con el 0001 hasta el número máximo que se alcance ese mismo día⁸. El uso de este tipo de numeración ofrece numerosas ventajas a nivel de los procesos analíticos dado que resulta ser una referencia ordenada y secuencial de la identificación de las muestras que se va a utilizar para el manejo de las mismas no sólo a lo largo de todos los procesos que se ejecutan dentro del propio Laboratorio, sino tam-

⁸ Eventualmente la numeración diaria puede confeccionarse empleando la fecha juliana conformando la estructura AAMDDXXXX, donde DDD corresponde al número de orden de los días a lo largo del año, comenzando el primer día del año en 001 y concluyendo el último en 365.

bién a nivel de los procesos post-analíticos, permitiendo definir así un sistema sumamente simple para el archivado y localización de las muestras de acuerdo al año, mes y día de ingreso (2).

- Dispositivos para la asignación de la numeración diaria a cada tarjeta al momento de la recepción de las mismas.
- Ingreso automático y secuencial de la numeración diaria al Sistema Informatizado de Gestión de Muestras.
- Tarjetas para identificación de segundas muestras o repeticiones.
- Tarjetas para identificación de muestras destinadas al monitoreo del tratamiento.
- Listas de trabajo para la identificación de muestras en las diferentes corridas analíticas⁹.
- Plantillas de distribución de muestras¹⁰.

Equipamiento requerido para automatizar los procesos pre-analíticos

- Soporte informático.
- Lectoras de códigos de barras.
- Máquina numeradora automática secuencial o impresora de etiquetas de códigos de barras para la asignación de numeración diaria.
- Soporte Web para la potencial transferencia electrónica de datos de los recién nacidos desde el centro asistencial de origen al laboratorio de pesquisa y para el seguimiento de envíos.

Procesos analíticos

Objetivos

- Incrementar la capacidad operativa de trabajo.
- Optimizar los recursos humanos.
- Simplificar los procedimientos operativos.
- Optimizar los procedimientos analíticos.
- Incrementar el rendimiento de los reactivos disminuyendo consecuentemente sus costos.
- Eliminar la necesidad de recurrir a procedimientos manuales tanto para el cálculo de resultados como para la validación de las corridas.

⁹ Se entiende por lista de trabajo a una planilla o archivo conteniendo información organizada, mínima y suficiente de cada una de las muestras que han de ser analizadas en una corrida determinada para un analito en particular, ordenada de acuerdo al orden en que se han de procesar las mismas, y a través de la cual, a posteriori, resultará posible establecer una vinculación directa, unívoca y sin errores entre los resultados obtenidos en cada corrida y el número de identificación de la muestra a partir de la cual se obtuvieron dichos resultados.

¹⁰ Se entiende por plantilla de distribución de muestras a un mapa o esquema en el cual se representa e identifica la posición correspondiente a cada una de las muestras que han de ser procesadas en las distintas microplacas que forman parte de una corrida determinada.

Procesos a automatizar

- “*Puncheo*” o corte de discos conteniendo la sangre de los recién nacidos y distribución en las microplacas de ensayo correspondientes.
- Dispensado de reactivos.
- Agitación de microplacas.
- Transferencia de eluidos.
- Remoción de discos de papel de filtro.
- Centrifugado de microplacas.
- Lavado de microplacas.
- Incubación de ensayos.
- Lectura de ensayos.
- Cálculo de resultados, validación de corridas, seguimiento del control de calidad interno y seguimiento del desempeño de los métodos.

Equipamiento requerido para automatizar los procesos analíticos

- Soporte informático.
- Lectoras de códigos de barras.
- Punchers automáticos.
- Equipamiento modular:
 - Dispensadores de reactivos.
 - Agitadores.
 - Centrífugas de microplacas.
 - Dispositivos para la transferencia de eluidos por vacío.
 - Incubadores.
 - Removedores de discos.
 - Lavadores de microplacas.
 - Lectores UV-Visible, Fluorómetros, Fluorómetros a tiempo resuelto.
- Equipamiento automatizado:
 - Autoanalizadores.

Sin lugar a dudas, el paso limitante o cuello de botella que se presenta cuando se intenta planificar la automatización del laboratorio de pesquisa resulta ser el proceso de *puncheo* o corte de discos y distribución en las diferentes plataformas de ensayo.

Este paso limitante se torna más crítico cuando se trabaja con métodos clásicos en los cuales se realiza un análisis para medir un analito y de esa manera detectar una patología en particular, puesto que se requerirán tantos discos de cada recién nacido como patologías formen parte del panel de pesquisa del programa. Por ejemplo para las 7 patologías definidas definidas como parte del panel básico, esto es Fenilcetonuria, Hipotiroidismo Congénito, Hiperplasia Suprarrenal Congénita, Fibrosis Quística, Galactosemia, Deficiencia de Biotinidasa y Enfermedad de Orina de Jarabe de Arce se deben realizar pruebas específicas para la medida de feni-

lalanina, TSH, 17OH-Progesterona, IRT, galactosa total, biotinidasa y aminoácidos de cadena ramificada respectivamente requiriéndose el corte de 7 discos, uno para cada prueba.

Esta situación se simplifica de manera significativa cuando se introducen plataformas de análisis de tipo múltiplex como la que provee la espectrometría de masa en tándem, en la cual, a partir del análisis de un disco conteniendo la sangre del recién nacido se puede llevar a cabo la determinación de múltiples analitos, y de esa manera detectar múltiples patologías.

Otras plataformas multiplex están representadas por los métodos del tipo isoelectroenfoque o HPLC empleados en la pesquisa de Hemoglobinopatías, o la tecnología Luminex empleada para la medida simultánea de T₄, TSH, IRT y 17OH-Progesterona a través de inmunoensayos basados en el uso de microesferas de poliestireno de colores específicos para cada analito y recubiertas con anticuerpos de captura -también específicos para cada medida-, y la medición de las señales correspondientes empleando dos sistemas láser (4).

Procesos post-analíticos

Objetivos

- Eliminar la necesidad de carga manual de resultados.
- Reducir la necesidad de una supervisión pormenorizada, muestra a muestra, durante los procesos de validación de resultados y de emisión de informes.
- Agilizar la disponibilidad de los resultados en los centros asistenciales.
- Simplificar los procesos de solicitud de segundas muestras, de seguimiento de recepción de las mismas, de solicitud de derivaciones y de reposición de materiales de trabajo.

Procesos a automatizar

- Carga de resultados.
- Validación de resultados a través de la aplicación de reglas automatizadas de aceptación y rechazo.
- Emisión y envío de informes de resultados.
- Solicitud de recolección de segundas muestras o de derivación de recién nacidos al centro de atención especializada, por resultados anormales.
- Solicitud de recolección de segundas muestras por recolección inadecuada o por incumplimiento de las condiciones preanalíticas de recolección.
- Seguimiento de llegada de segundas muestras.
- Reclamo de llegada de segundas muestras (en caso que no hayan sido recibidas).
- Reposición de tarjetas de recolección de muestras y materiales de trabajo.

Equipamiento requerido para automatizar los procesos pre-analíticos

- Soporte informático.
- Soporte Web para el acceso personalizado a los resultados por parte de cada centro asistencial de origen.

Beneficios específicos de la automatización del laboratorio de pesquisa

Como corolario a este capítulo se presenta a continuación un detalle de los principales beneficios específicos resultantes de la automatización del laboratorio de Pesquisa Neonatal:

- Eliminación de errores en el proceso de tipeo de números de identificación de muestras y de códigos de identificación de remitentes.
- Procesamiento simultáneo de un número significativo de muestras por corrida.
- Rápida disponibilidad de resultados.
- Identificación segura de muestras en corridas según listas de trabajo.
- Minimización de errores por transposición de muestras y por corrimiento del marco de lectura.
- Acceso a lectura instrumental y a registros impresos de las mismas.
- Eliminación de cálculos manuales y fácil manejo de bases de datos.
- Eliminación de errores en la transcripción de resultados.
- Eliminación de errores por omisión de resultados anormales.
- Reducción en los tiempos de supervisión de resultados y procesos.
- Reducción del tiempo-hombre de análisis y aumento en la capacidad de trabajo.
- Mayor aprovechamiento de recursos humanos.
- Optimización de los sistemas de seguimiento.

Referencias

1. Liscouski J, "Laboratory Automation" en "Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry. Settle F Ed, Prentice Hall Ptr, Chapter 6, 101-118, 1997.
2. Therrell B, "Automation and Computerization in Newborn Screening" en "Laboratory Methods for Neonatal Screening". Therrell BL Ed, American Public Health Association, Washington, 1-21, 1993.
3. Dobbins RH, Kling S, Wooden H. "Joint ASTPHLD/CORN Standardization Committee Report on Forms, Formats and Data Collection". Report of Joint ASTPHLD/CORN Committee on Neonatal Screening Standardization and Recommendations. Second Draft, 31-5, 1996.
4. Bellisario R, Colinas RJ, Pass KA, "Simultaneous Measurement of Thyroxine and Thyrotropin from Newborn Dried Blood-Spot Specimens Using a Multiplexed Fluorescent Microsphere Immunoassay", Clinical Chemistry 46 (9), 1422-1424, 2000.

CAPÍTULO 5

Validación de métodos

Introducción

Se entiende por Validación de Métodos al proceso utilizado para confirmar que el procedimiento analítico bajo consideración presenta características de performance consistentes con el uso para el cual ha sido diseñado (1).

En un sentido más amplio, la Organización Mundial de la Salud ha definido a la Validación de Métodos como la acción o proceso de demostrar que un procedimiento, proceso, sistema, equipamiento o método en uso, funciona tal como lo esperado y cumple con los resultados previstos (2).

En consecuencia, y tal como se puede inferir a partir de las definiciones anteriores, el objetivo del proceso de Validación consiste en asegurar la producción de resultados confiables y de alta calidad para análisis diagnósticos (3), resultando necesaria su ejecución toda vez que se requiera verificar que los parámetros de performance de un método son los esperados.

A continuación se listan 4 de las principales situaciones que en la práctica diaria ameritan la validación de un método:

- a) Toda vez que se introduce una nueva tecnología o un nuevo principio analítico en el Laboratorio.

El cumplimiento de esta condición resulta fundamental para garantizar a su vez el cumplimiento de las exigencias de calidad analítica y diagnóstica, requerimiento que implica que ningún método de pesquisa debe ser puesto en rutina sin haber sido validado previamente.

- b) Toda vez que se efectúa un cambio en el procedimiento seguido por alguno de los métodos en uso –aún cuando dichos métodos ya hayan sido validados previamente–, como por ejemplo al realizar un cambio en el instrumental de lectura.

En estos casos, la extensión que ha de requerir este proceso de validación o revalidación dependerá de la naturaleza de los cambios que hayan sido realizados y de las circunstancias en las cuales el método está siendo utilizado (1).

- c) Cuando los resultados del control de calidad indican que el desempeño de un método determinado está cambiando con el tiempo.

En estos casos, a través del proceso de validación de métodos se va a intentar detectar cuales son las causas de los cambios observados en el desempeño del método, y a partir de allí implementar las acciones correctivas que corresponda.

- d) Para demostrar la equivalencia entre 2 métodos, procedimiento denominado estudio de comparación de métodos.

Validación de métodos de Pesquisa Neonatal

Abordaje

En el caso de la Pesquisa Neonatal un proceso de Validación de Métodos apropiadamente ejecutado requiere ser abordado desde 5 puntos de vista:

- Analítico.
- Diagnóstico.
- Operativo.
- De diseño.
- De costos.

Limitaciones prácticas

Si bien la exigencia de validación de los métodos de pesquisa no puede ser ignorada, es importante destacar que en la práctica dicho procedimiento no resulta ser una tarea de sencilla resolución puesto que cuando se intenta llevar a cabo el mismo se debe hacer frente a diversas dificultades resultantes de la escasa disponibilidad y limitado acceso a las herramientas necesarias para su ejecución, fundamentalmente en lo que se refiere a la validación de algunos parámetros analíticos y diagnósticos, dificultades a las que se detalla a continuación:

- Ausencia de métodos de referencia.
- Escasa disponibilidad de estándares de referencia preparados en sangre entera impregnada en papel de filtro, y aplicabilidad relativa en el caso de los materiales de referencia existentes dependiendo de la capacidad de absorción del papel de filtro utilizado, del hematocrito de la sangre empleada en la preparación, y del volumen de sangre empleado para la obtención de las manchas (4).
- Ausencia de protocolos de validación específicamente diseñados para pruebas de Pesquisa Neonatal, dando lugar a una necesidad de tener que extrapolar los protocolos generales de validación diseñados para el laboratorio de análisis clínicos, o eventualmente, a que sea el propio usuario quien defina qué tipo de materiales utilizar para hacer la validación, el número de niveles de concentración y de replicados a utilizar, y el número de corridas a realizar.

- Escasez de recomendaciones o normativas referentes a los criterios de aceptación a utilizar, hecho que determina que una vez más sea el usuario quien defina la modalidad a seguir para el análisis de los resultados, los criterios estadísticos a emplear y la forma en que va llevar a cabo la interpretación de los mismos.
- Limitaciones para acceder a paneles de sensibilidad apropiados.

Parámetros a validar

Parámetros analíticos

1. **Especificidad:** se define a la especificidad como la capacidad de un método de medir solamente aquel analito para el cual ha sido diseñado (1,5).

En un sentido más amplio puede definirse también como la capacidad de determinar inequívocamente un analito en presencia de componentes que puede esperarse que estén presentes, los cuales típicamente pueden incluir impurezas, degradantes, elementos propios de la matriz y otros.

En función de esta última definición, la especificidad puede ser referida como un parámetro que evalúa la confiabilidad de las medidas en presencia de interferencias (1).

2. **Exactitud:** la exactitud es una medida de la concordancia entre el valor medido experimentalmente y el valor verdadero o de referencia del analito en cuestión (1,5-9).

Habitualmente la exactitud es utilizada como un indicador que refleja la presencia de errores sistemáticos. Sin embargo, cuando se aplica a una serie de resultados de una prueba determinada, la misma refleja una combinación de errores sistemáticos y aleatorios (1,7).

La exactitud no posee un valor numérico (6,8), siendo la inexactitud -conocida también como bias- el parámetro que permite su cuantificación (7):

$$\text{Inexactitud} = [\text{Valor experimental} - \text{Valor verdadero}]$$

3. **Precisión:** la precisión es una medida de la concordancia entre replicados independientes de una serie de medidas obtenidas bajo condiciones estipuladas (1,6-9). En otros términos, es un indicador de la variabilidad o dispersión de una medida en torno a su valor central que denota la presencia de errores aleatorios (1).

La precisión es un parámetro independiente del valor verdadero o especificado del analito en cuestión (1) y no posee un valor numérico (6,9), por lo cual su expresión cuantitativa se realiza en términos de imprecisión a través de dos parámetros que son el Desvío Estándar (DS) y el Coeficiente de Variación (CV) (7).

Por otra parte, al hablar de precisión es importante establecer una diferenciación entre los conceptos de repetibilidad y reproducibilidad de un método. De este modo, cuando se habla de repetibilidad se hace referencia a los resultados de una serie de medidas obtenidos en condiciones de repetibilidad, es decir con el mismo método, en el mismo laboratorio, con el mismo operador, utilizando el mismo equipamiento y en intervalos cortos de tiempo; mientras que cuando se habla de reproducibilidad se hace referencia

a los resultados de una serie de medidas obtenidos en condiciones de reproducibilidad, es decir con el mismo método, en diferentes laboratorios, con diferentes operadores y utilizando equipamiento diferente (1).

4. **Sensibilidad analítica:** se define la sensibilidad analítica como el cociente entre el cambio en la respuesta de un instrumento de medida y el correspondiente cambio en la cantidad del analito medido (1). En otros términos, es un parámetro que queda definido por la pendiente de la curva de calibración (8), de manera tal que cuanto mayor sea dicha pendiente, mayor será la sensibilidad analítica del método.

En función de esta definición, se dice que un método posee una sensibilidad analítica apropiada cuando es capaz de responder dando lugar a pequeños cambios en la concentración del analito medido a partir de pequeños cambios en la señal de lectura.

5. **Linealidad:** se define la linealidad como la capacidad de un método de obtener resultados proporcionales a la concentración del analito medido (1,5).

Por carácter transitivo, el rango de linealidad es el rango de concentraciones en el cual un método determinado da resultados proporcionales a la concentración del analito (1).

6. **Recuperación analítica:** se entiende por recuperación analítica a la fracción de analito adicionada a una muestra antes de su análisis (1,5). Es una medida de la eficiencia de un método para detectar todo el analito presente en una muestra (1), o más específicamente para detectar o “recuperar” todo el analito añadido exógenamente a una matriz biológica y extraído desde la misma (9).

El parámetro utilizado para su cuantificación es la recuperación analítica porcentual (R%), la cual se determina según la siguiente fórmula:

$$R\% = [(CME - CMNE)/CA] \times 100$$

donde CME es la concentración medida en la muestra enriquecida, CMNE es la concentración medida en la muestra no enriquecida, y CA es la concentración de analito añadida exógenamente a la muestra enriquecida.

La recuperación analítica es una propiedad que depende de la matriz de la muestra, del procedimiento de análisis de la misma y de la concentración del analito medido (5), razón por la cual no necesariamente debe ser del 100 %, sino que la extensión de la misma debe ser consistente, precisa y reproducible (9).

Por otra parte, siempre se debe tener en cuenta que el analito introducido exógenamente muy probablemente no se encuentre “vinculado o asido” al resto de los componentes de la matriz de la misma forma que el analito naturalmente presente, por lo cual la estrategia de enriquecimiento exógeno de la muestra puede aportar una impresión no real de la capacidad de recuperación analítica del método (1).

7. **Rango:** es el intervalo de concentraciones dentro del cual un método determinado de muestra tener características analíticas apropiadas (5).

8. **Robustez:** se define la robustez como la capacidad de un método de mantener inalteradas sus propiedades ante pequeños pero deliberados cambios en los parámetros del

método, siendo por lo tanto un indicador de la confiabilidad que ha de presentar un método determinado cuando el mismo es utilizado a lo largo del trabajo diario (1,5).

9. **Límite de Detección:** es la mínima concentración de analito presente en una muestra que puede ser detectada aunque no necesariamente cuantificada, bajo las condiciones establecidas de una prueba (1,5).

Según otros organismos también puede definirse como el mínimo contenido de analito que puede ser medido con razonable certeza estadística (1).

Experimentalmente se determina realizando una serie de 10 medidas independientes de los blancos de muestras, y empleando el siguiente criterio de cálculo:

$$LD = X_{\text{BLANCO}} + 3DS$$

donde LD es el límite de detección, X la media de los replicados del blanco y DS el desvío estándar de dichas mediciones.

Por otra parte, y considerando que tanto la media como el desvío estándar son probablemente dependientes de la matriz del blanco, se debe tener en cuenta que el límite de detección también será dependiente de las características de dicha matriz (1).

Conocer el límite de detección de un método es una exigencia de real importancia, particularmente en aquellas medidas que se realizan a bajas concentraciones directamente vinculadas o asociadas a la toma de decisiones críticas.

Parámetros diagnósticos

Para un mejor entendimiento de los parámetros diagnósticos que deben ser validados en las pruebas de Pesquisa Neonatal, es recomendable utilizar una tabla de doble entrada en la cual por un lado, se presenta la interpretación del resultado obtenido en la prueba de pesquisa y, por el otro, el estado de salud o enfermedad que caracteriza a cada individuo (10) (Tabla 15).

Tabla 15. Resultados de las pruebas de pesquisa vs. estado de enfermedad

Resultado	Estado de enfermedad		Total
	<i>Ausente</i>	<i>Presente</i>	
<i>Normal</i>	NV	FN	(NV + FN)
<i>Anormal</i>	FP	PV	(PV + FP)
Total	(NV + FP)	(PV + FN)	(PV+NV+FN +FP)

NV: Negativo Verdadero. PV: Positivo Verdadero. FN: Falso Negativo. FP: Falso Positivo.

1. **Sensibilidad (S):** se define como la probabilidad de que un individuo enfermo presente un resultado anormal (5):

$$S = PV / (PV + FN) \times 100.$$

La sensibilidad es un parámetro que expresa la capacidad de un método de identificar correctamente a aquellos individuos que padecen la enfermedad e, indirectamente, da una idea del porcentaje de falsos negativos que presentará el mismo.

2. **Especificidad (E)**: se define como la probabilidad de que un individuo sano presente un resultado normal (6):

$$E = NV/(NV + FP) \times 100.$$

La especificidad es un parámetro que expresa la capacidad de un método de identificar correctamente a aquellos individuos que no padecen la enfermedad e, indirectamente, da una idea del porcentaje de falsos positivos que presentará el mismo.

3. **Exactitud Diagnóstica (ED)**: es la probabilidad de que un individuo sano o enfermo sea correctamente clasificado:

$$ED = (NV+PV)/(PV+NV+FN +FP) \times 100.$$

4. **Valor Predictivo Positivo (VPP)¹¹**: es la probabilidad de que un individuo padezca realmente la enfermedad cuando el resultado de la prueba es anormal (6):

$$VPP = PV/(PV+FP) \times 100.$$

Se trata de un parámetro que da una medida del rendimiento que tiene la prueba de detección (10).

5. **Valor Predictivo Negativo (VPN)¹²**: es la probabilidad de que un individuo sea sano cuando el resultado de la prueba es normal (6):

$$VPN = NV/(NV+FN) \times 100.$$

6. **Prevalencia (P)**: es el número de casos detectados en la población total (6):

$$P = (PV+FN)/(PV+NV+FN+FP) \times 100.$$

Parámetros operativos

Considerando que las pruebas de Pesquisa Neonatal son pruebas de aplicación masiva que requieren que cada Laboratorio analice diariamente un número significativo de muestras, entonces resulta incuestionable afirmar que los aspectos operativos de los métodos de medida van a jugar un rol crítico en lo que se refiere a la factibilidad de realización de las mencionadas pruebas en tiempo y forma. En consecuencia, los parámetros operativos más importantes a validar deben ser los siguientes:

1. **Sencillez y simpleza**: como una condición estrictamente necesaria se requiere que los protocolos de ensayo de los métodos de medida a utilizar no involucren procedimientos complejos que dificulten la realización de las pruebas sino que, por el contrario, presenten características tales que hagan una contribución a la simplificación operativa de las mismas. De este modo, al realizar la validación de un método deberá prestarse especial atención a los siguientes aspectos:
 - a) Volumen, grado de manipulación y de preparación de muestras requeridos.

¹¹ El valor predictivo positivo de una prueba depende de la sensibilidad y especificidad de la misma como así también de la prevalencia de la enfermedad (12), encontrándose que el mismo aumenta a medida que se incrementan la especificidad y la prevalencia.

¹² El valor predictivo negativo también depende de la sensibilidad y especificidad de la prueba y de la prevalencia de la enfermedad (12), por lo que el mismo aumenta a medida que se incrementa la sensibilidad y disminuye la prevalencia.

- b) Tamaño de las corridas a realizar, en cuanto a la existencia de posibles limitaciones en relación al número máximo de muestras que pueden ser procesadas por corrida.
- c) Procedimientos sencillos.
- d) Habilidad técnica y condiciones de seguridad exigidas (6).
- e) Tiempos de incubación de las pruebas, preferentemente ajustados para permitir su resolución en un único turno de trabajo, o eventualmente post-incubación “*overnight*”.

2. Número de pasos:

- a) Protocolos de ensayo con la menor cantidad de pasos y procedimientos posibles.
- b) Preparación de los reactivos simple y sencilla, estableciéndose como situación ideal que los mismos sean provistos listos para usar.

3. Formato de ensayo:

- a) Formato de ensayo apropiado, fácilmente manejable y, de ser factible, generalizable a todas las pruebas (por ejemplo, microplacas de 96 pocillos).

4. Factibilidad de automatización: si bien la automatización no resulta ser una condición de trabajo estrictamente necesaria dado que la mayor parte de los procedimientos analíticos que se realizan en el mismo pueden ser ejecutados en forma manual, se recomienda evaluar la factibilidad de la misma a efectos de abrir una posibilidad para aumentar el rendimiento de las pruebas y para la estandarización de las mismas.

Parámetros de diseño

1. Características del método: es recomendable que los métodos a utilizar sean métodos diseñados específicamente para trabajar sobre muestras de sangre entera colectadas en papel de filtro.

Por otra parte, y si bien no se trata de una exigencia excluyente, es importante priorizar el uso de métodos cuantitativos sobre el de métodos cualitativos o semicuantitativos. Cumplir con esta última recomendación permite acceder a una mayor capacidad de diferenciación entre individuos afectados e individuos normales, detectar formas moderadas o leves de las patologías pesquisadas que de otra forma serían perdidas, y contar con un registro informatizado y/o impreso de las lecturas obtenidas a través de instrumentos específicos.

Este tipo de registros instrumentales no sólo resultan importantes desde el punto de vista analítico y diagnóstico sino también desde el punto de vista legal, puesto que contar con los mismos ofrece un respaldo de trazabilidad y verificabilidad del trabajo realizado, que de otra forma no podría ser cumplimentado en igual magnitud en el caso de que las lecturas se efectúen en forma visual o manual.

2. Características de los calibradores: otro aspecto que resulta de fundamental importancia es que los calibradores a utilizar estén preparados en una matriz lo más similar posible a la de las muestras de sangre de los recién nacidos.

En relación a este punto, es importante destacar que en la práctica no es infrecuente encontrar situaciones en las cuales algunos calibradores están preparados con glóbu-

los rojos de origen animal en lugar de glóbulos rojos de origen humano, o que en lugar de suero o plasma han sido adicionados de una solución de albúmina o de solución fisiológica, y como es de suponer, estas diferencias de matriz pueden dar lugar a respuestas analíticas diferenciales entre los calibradores y las muestras de los recién nacidos, haciendo así una contribución adicional a la variabilidad analítica y a la generación de potenciales errores diagnósticos.

- 3. *Adaptaciones de métodos concebidos para trabajar sobre muestras líquidas:*** es recomendable que los métodos de medida a utilizar en las pruebas de pesquisa no sean métodos concebidos originalmente para trabajar sobre muestras de suero o plasma.

Eventualmente, y en caso de que no se cumpla con la recomendación anterior, resulta imprescindible que los mismos hayan sido sometidos previamente a las modificaciones, adaptaciones y evaluaciones necesarias a efectos de asegurar su correcto desempeño analítico y diagnóstico en todo el rango de concentraciones de interés clínico.

Como se puede inferir a partir del concepto anterior, la adaptación de este tipo de métodos para su empleo sobre muestras de sangre entera colectadas en papel de filtro, no es un procedimiento contraindicado. No obstante, el mismo requiere esencialmente que dicha adaptación sea realizada con mucho criterio, para lo cual en primer lugar debe introducirse indefectiblemente el uso de calibradores preparados en la misma matriz que las muestras de sangre de los recién nacidos que han de analizarse.

Esta primer consideración resulta de vital importancia puesto que en caso de que se continúen utilizando los calibradores líquidos originales del método, preparados ya sea en solución acuosa o proteica, éstos no requerirán su elusión del papel de filtro, y consecuentemente el proceso de elusión de las muestras de recién nacidos carecerá de una contraparte en los calibradores que permita tener todo el proceso bajo control y asegurar que no se produjeron cambios en la respuesta a expensas de una variación en la eficiencia de la elusión.

Además de lo mencionado precedentemente, también debe tomarse en consideración que la respuesta analítica de un calibrador líquido estará sujeta a diferentes factores de reacción con respecto a los que ejercen su acción cuando se analizan muestras de sangre colectadas en papel de filtro, es decir que en tal caso entrará en juego un efecto de matriz, el cual, dependiendo de las características del método, podrá tener mayor o menor influencia en los resultados finales.

Parámetros de costos

Partiendo de las mismas premisas que fueron tomadas en consideración en el caso de los parámetros operativos, los métodos de pesquisa deben cumplir con la condición de que las pruebas deben ser económicas o, al menos, tener un costo accesible

De esta forma será posible garantizar su implementación masiva en toda la población neonatal, haciendo así una contribución a la equidad en el acceso de todos los individuos al Sistema de Atención de Salud.

Problemas detectados a través del procedimiento de validación de métodos

- Inapropiada especificidad analítica:
 - Reacciones cruzadas con anticuerpos empleados en diferentes inmunoensayos.
 - Reacción inespecífica con sustancias estructuralmente relacionadas o con sustancias interferentes.
- Inadecuada sensibilidad analítica.
- Falta de exactitud asociada a una incorrecta asignación de valores a los calibradores, presentándose las siguientes situaciones posibles:
 - Sobre o subestimación constante a lo largo de todo el rango de trabajo.
 - Sobre o subestimación directa o inversamente proporcional a la concentración del analito.
 - Comportamiento dual por encima y por debajo de una concentración crítica determinada.
- Recuperación analítica inadecuada asociada a la inexactitud del método.
- Incrementada imprecisión.
- Pérdida de linealidad a concentraciones elevadas.
- Falta de robustez.
- Inapropiada tasa de falsos negativos: baja sensibilidad diagnóstica.
- Elevada tasa de falsos positivos: inapropiada especificidad diagnóstica.
- Diferencias entre la matriz de los calibradores y la matriz de las muestras.
- Calibradores preparados empleando un volumen de sangre por mancha inferior al recomendado para las muestras de recién nacido.

Referencias

1. Eurachem Guide. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". First English Edition 1.0, 1998. www.eurachem.org/guides/valid.pdf
2. WHO. Expert Committee on Biological Standardization. "Glossary of Terms for Biological Substances Used for Texts of the Requirements". WHO unpublished document BS/95.1793. Geneva: World Health Organization; 1995.
3. ERNDIM BIOMED II Newsletter, N° 1, October 1998.
4. Adam BW, Alexander JR, Smith SJ, Chace DH, Loeber JG, Elvers LH and Hannon WH. "Recoveries of Phenylalanine from Two Sets of Dried-Blood-Spot Reference Materials: Prediction from Hematocrit, Spot Volume, and Paper Matrix". Clin. Chem. 46, 126-8, 2000.
5. ERNDIM BIOMED II Newsletter, N° 2, June 1999.

6. Slazyk WE and Hannon WH. "Quality Assurance in the Newborn Screening Laboratory" en "Laboratory Methods for Neonatal Screening", Therrell BL Ed, American Public Health Association, Washington, 23-46, 1993.
7. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). "Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Measurement Procedures"; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document EP10-A3, Vol 26 N° 34, 2006.
8. ISNS Standing Committee on Quality Assurance. "Lexicon of Terms to be used in Newborn Screening". 2005. www.isns-neoscreening.org/pdf/Lexicon8.pdf
9. US Department of Health and Human Services – Food and Drug Administration. "Guidance for Industry. Bioanalytical Method Validation". May 2001. www.fda.gov/cder/guidance/4252fml.htm
10. Richter Arís C, Cáceres AL. "Fase Posanalítica" en "Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico", Fernández Espina C y Mazziotta D Eds. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas, 513-36, 2005.

CAPÍTULO 6

Calidad en Pesquisa Neonatal

Introducción

Las tecnologías utilizadas en el laboratorio de Pesquisa Neonatal están representadas por un conjunto de procesos analíticos basados en diferentes principios metodológicos e instrumentales de características diversas, los cuales -independientemente de las limitaciones a las cuales se deba hacer frente en lo que respecta a recursos disponibles- requieren que la calidad de las pruebas sea monitoreada, sostenida y mejorada en forma permanente a medida que dichas tecnologías se expanden y evolucionan (1).

Por otra parte, y en vista de los objetivos específicos de la Pesquisa Neonatal, resulta estrictamente necesario que todos los laboratorios de pesquisa posean la capacidad tanto de proveer prestaciones de alta calidad analítica, como de analizar una gran cantidad de muestras en forma simultánea, de reportar rápidamente los resultados y de cumplimentar estas tareas a un costo adecuado y lo más accesible posible (2). Y si bien estos requerimientos se corresponden con las condiciones exigibles a los laboratorios de análisis clínicos generales y mayormente no difieren de estas últimas, resulta muy importante dejar en claro que los laboratorios de Pesquisa Neonatal deben ser considerados como una categoría especial de laboratorios puesto que en ellos entran en juego una serie de variables que les son propias y específicas (Tabla 16) y que pueden afectar los resultados en forma diferente, ya sea tanto desde el punto de vista cuali como cuantitativo (2).

Tabla 16. Variables propias y específicas de laboratorios de Pesquisa Neonatal

- Matriz y soporte de las muestras de sangre
- Técnica, tiempos y condiciones de recolección de muestras
- Condiciones de secado, transporte y conservación de muestras
- Características intrínsecas de las muestras:
 - Tipo de papel de filtro
 - Volumen de sangre por mancha
 - Hematocrito
- Zona de corte o “puncheo”: efecto cromatográfico
- Elusión de muestras
- Mayor imprecisión relativa en los métodos de medida

Variables propias y específicas de los laboratorios de Pesquisa Neonatal

Matriz y soporte de la muestras de sangre

Los especímenes que se utilizan para la realización de las pruebas de Pesquisa Neonatal no son muestras líquidas sino que se trata de muestras de sangre entera seca impregnadas en papel de filtro. Este hecho determina que el análisis de las mismas no se realice a partir de una medida volumétrica sino a partir de un área definida de papel de filtro impregnada con la sangre y que, consecuentemente, resulte necesario establecer una correlación o correspondencia entre dicha área de papel y la mencionada medida volumétrica.

De este modo, toda vez que se procese una muestra impregnada insuficientemente se estará introduciendo un factor de variabilidad adicional equivalente a cometer un error de pipeteo por defecto cuando se trabaja en un laboratorio de análisis clínicos empleando muestras líquidas.

Técnica, tiempos y condiciones de recolección de muestras

Tanto el procedimiento empleado para llevar a cabo la recolección de muestras como los tiempos y condiciones recomendados para la misma introducen una variabilidad adicional en las pruebas, la cual en algunos casos resulta ser de índole analítica mientras que en otros, particularmente en aquellos casos en los que las muestras son colectadas antes de las 24 horas de vida, resulta ser de índole biológica, pudiendo dar lugar tanto a resultados falsos negativos como a resultados falsos positivos.

Dicha variabilidad queda definida, entre otros, por factores como la adherencia a los tiempos y condiciones de recolección previamente definidos, a la preparación del recién nacido, al cuidado y habilidad del extraccionista para realizar la punción, y a la calidad de impregnación de la sangre en el papel de filtro (2).

Condiciones de secado, transporte y conservación de muestras

Una estricta adherencia a las normas definidas para la ejecución y cumplimentación de estos procedimientos constituye otro elemento clave a tomar en consideración a efectos de minimizar y/o eliminar determinadas variables vinculadas a los mismos, entre las cuales, las condiciones de temperatura y humedad juegan un rol fundamental.

De este modo, ajustándose a las recomendaciones establecidas (3) será posible realizar una contribución adicional a fin de garantizar una óptima calidad de las muestras, evitar el efecto cromatográfico que puede presentarse cuando las muestras son secadas en posición verti-

cal, evitar una fijación indeseada de las proteínas al papel de filtro, y asegurar que los analitos se mantengan estables hasta el momento de su análisis.

Características intrínsecas de las muestras

Tipo de papel de filtro

En relación al tipo de papel de filtro utilizado para la recolección de muestras se debe mencionar que el volumen de sangre absorbido por unidad de área de papel es función del tipo y lote del mismo (4-6) y que además su capacidad de absorción está fuertemente influenciada por su uniformidad. Esta propiedad determina que, indefectiblemente, todo lote de papel de filtro que ha de ser puesto en circulación deba ser previamente validado en relación a sus características de absorción.

En tal sentido, el Centers for Disease Control and Prevention - CDC de los EE.UU. (3) ha desarrollado un protocolo que permite determinar la capacidad de absorción del papel de filtro expresada como volumen de suero absorbido por unidad de área de papel, habiéndose establecido que el rango aceptable de volumen de suero por cada disco de ≈ 3.2 mm de diámetro (1/8”), cuando la mancha de sangre es obtenida a partir de una alícuota de 100 μ l de sangre entera, de hematocrito 55 %, con glóbulos rojos intactos lavados es de 1.44 ± 0.20 μ l; mientras que dicho rango es de 1.54 ± 0.17 μ l cuando la mancha de sangre es obtenida en las mismas condiciones anteriores pero con glóbulos rojos intactos no lavados.

En la práctica, y en vista de que este procedimiento de validación excede el alcance de los laboratorios de Pesquisa Neonatal, y de que el mismo debería ser efectuado en forma objetiva por un organismo independiente de la industria, el Newborn Screening Quality Assurance Program del Centers for Disease Control and Prevention (NSQAP-CDC) de EE.UU realiza periódicamente dicha validación a aquellos papeles de filtro comercializados mayoritariamente a nivel mundial, y emite anualmente un informe que refleja la capacidad de absorción de cada nuevo lote que es puesto en circulación (1,4,7).

Volumen y hematocrito de la sangre

El primer concepto que debe mencionarse en relación a estas dos variables es que los resultados obtenidos en las pruebas de pesquisa son influenciados en forma directa tanto por el “tamaño” de la gota de sangre con que se impregna el papel de filtro como por el hematocrito de la misma, encontrándose que a mayor volumen de sangre por mancha mayor será la concentración del analito medido, mientras que a mayor hematocrito la concentración será mayor solamente si el analito a medir se localiza exclusivamente en glóbulos rojos o en glóbulos rojos y plasma (8) .

La influencia del volumen de sangre por mancha y del hematocrito de la sangre resulta muy claramente ilustrada por las experiencias de Adam B. y colaboradores (9) quienes realizaron un estudio comparativo entre 2 materiales de referencia para fenilalanina -uno preparado por el Eu-

ropean Working Standard (EWS-01) y otro preparado por el CDC (AARM)-, los cuales diferían en el volumen de sangre utilizado para impregnar las manchas en el papel de filtro (35 μ l vs 100 μ l) y también en el hematocrito de la misma (50.1 % vs 53.0 %).

En dicho estudio pusieron en evidencia por un lado, que la recuperación analítica de fenilalanina en muestras de sangre de hematocrito 55 %, enriquecidas con 8.0 mg/dl de Phe y dispensadas en papel de filtro Schleicher & Schuell # 903 en volúmenes de 35 y 100 μ l, fue un 10.9 % superior en el caso de las manchas de mayor volumen y, por el otro, que una diferencia del orden del 3 % en el hematocrito como la que se presentaba entre ambos materiales de referencia se traducían en una diferencia en la recuperación analítica del 3.1 %.

Adicionalmente, el efecto del hematocrito también ha sido puesto en evidencia en otras experiencias, en este caso sobre los niveles de aminoácidos y acilcarnitinas determinados por espectrometría de masa en tándem, aunque en proporciones variables dependiendo del analito evaluado (10,11).

Por otra parte, se debe mencionar que el efecto del volumen y el hematocrito también puede ser puesto en evidencia a simple vista determinando el diámetro alcanzado por la mancha de sangre en el papel de filtro, aunque en este caso se encuentra que dicho diámetro será mayor cuanto mayor sea el volumen de sangre, pero será menor cuanto mayor sea el hematocrito. Esta última característica se debe al hecho de que a medida que la sangre se enriquece en el componente celular (“particulado”) con respecto al componente líquido (plasma), la misma se torna más viscosa y se pone en juego una mayor resistencia a su difusión en la matriz del papel de filtro.

Zona de corte o *puncheo* de muestras

Un aspecto sumamente importante que debe ser tomado en consideración en relación a la zona de corte o “*puncheo*” de las muestras es que los resultados obtenidos al dosar un analito determinado pueden presentar diferencias estadísticamente significativas dependiendo de si el disco para el análisis es tomado de una posición central o de una posición periférica de la mancha, y de si el analito en estudio se encuentra localizado exclusivamente en el plasma -como ocurre por ejemplo con la TSH-, o exclusivamente en los glóbulos rojos -como se observa por ejemplo con la enzima Galactosa-1-fosfato uridil transferasa.

Este fenómeno es debido a la presencia de un efecto cromatográfico que se traduce en una difusión diferencial entre los compartimientos líquido (plasma) y particulado (células sanguíneas) de la sangre en el papel de filtro, determinando que la mancha de sangre presente una mayor concentración de células en la zona central de la misma con respecto a su periferia.

En las Tablas 17 y 18 se presentan los resultados obtenidos en el laboratorio de la Fundación Bioquímica Argentina al analizar 5 manchas de sangre de hematocrito 50 % correspondientes a 3 materiales de control preparados con diferentes niveles de TSH y fenilalanina, los

cuales fueron procesados tomando 5 discos de cada mancha, 4 de ellos de posiciones periféricas (N, S, E y O) y 1 de la posición central (C) (12).

Sobre cada uno de estos discos se llevó a cabo la medida de TSH y fenilalanina en una única corrida empleando la metodología AutoDELFIA y un método Fluorométrico de Preparación propia para uno y otro analito respectivamente, y posteriormente se realizó un análisis estadístico de comparación de medias con un test de Student, agrupando por un lado, los resultados correspondientes a las posiciones periféricas y, por el otro, los correspondientes a las posiciones centrales.

Tabla 17. Efecto de la zona de corte en la medida de TSH

	TSH ($\mu\text{U/ml}$)				p
	<i>Posiciones periféricas</i>		<i>Posiciones Centrales</i>		
Nivel	N	X \pm DS	N	X \pm DS	
# 1	20	14.4 \pm 1.20	5	12.3 \pm 0.69	< 0.005
# 2	20	39.1 \pm 2.83	5	34.2 \pm 1.26	< 0.005
# 3	20	58.3 \pm 4.08	5	53.2 \pm 2.15	< 0.05

Tabla 18. Efecto de la zona de corte en la medida de fenilalanina

	Fenilalanina (mg/dl)				P
	<i>Posiciones periféricas</i>		<i>Posiciones Centrales</i>		
Nivel	N	X \pm DS	N	X \pm DS	
# 1	20	3.2 \pm 0.24	5	3.2 \pm 0.23	ns
# 2	20	5.7 \pm 0.33	5	5.4 \pm 0.18	ns
# 3	20	7.3 \pm 0.55	5	7.5 \pm 0.25	ns

Tal como era de esperar, los resultados obtenidos permiten demostrar que en el caso de TSH se presentan diferencias significativas entre los niveles del analito medido, encontrándose que la concentración de TSH resulta más alta en las posiciones periféricas a consecuencia de la mayor proporción de plasma que presentan las mismas con respecto a las posiciones centrales, lo cual a su vez certifica la presencia del efecto cromatográfico antes descrito (12).

En contraposición, en el caso de fenilalanina, dichas diferencias no resultan significativas debido al hecho de que este aminoácido se distribuye igualmente entre el compartimiento plasmático y los glóbulos rojos (13), haciendo imperceptible la presencia del mencionado efecto.

Independientemente de estos últimos resultados, una de las experiencias a las cuales se hizo referencia al describir la influencia del hematocrito sobre la medida de aminoácidos y acilcarnitinas por espectrometría de masa en tándem (10) también incluyó una evaluación de la influencia de la zona de corte de los discos sobre los resultados de los mismos. De este modo se encontró un efecto directo sobre los niveles de varios analitos, el cual resultó especialmente significativo dentro de un subgrupo determinado de ellos a valores bajos de hematocrito, poniendo en evidencia además la interacción que existe entre ambos factores.

Por último, es importante destacar que la magnitud del efecto cromatográfico también resulta influenciada por el volumen de sangre utilizado para impregnar el papel de filtro, observándose que el mismo toma mayor relevancia cuanto mayor es el volumen de sangre por mancha.

Elusión de las muestras

Dependiendo del analito a evaluar y del principio analítico del método de medida utilizado se pueden presentar dos alternativas en relación al proceso de elusión de muestras, las cuales son descriptas a continuación:

Elusión total de la sangre del papel de filtro

En estos casos se requiere llevar a cabo la elusión completa de la sangre utilizando para ello un buffer de elusión determinado, como se realiza por ejemplo en las medidas de TSH, IRT, 17OH-Progesterona y biotinidasa.

Elusión selectiva de alguno de sus componentes

En estos casos es necesario realizar una primera etapa de desnaturalización o fijación diferencial de las proteínas plasmáticas y la hemoglobina al papel, proceso que a su vez puede ser realizado siguiendo dos estrategias diferentes:

- **Por acción química:** en esta alternativa la fijación de las proteínas al papel se realiza empleando un agente fijador como Etanol 70 %, Metanol/Acetona/Agua, Etanol/SO₄Zn, Ácido Tricloroacético, etc.; y posteriormente se lleva a cabo la elusión del analito de interés, en algunos casos con la misma solución fijadora, o en otros con H₂O o un buffer determinado, previa evaporación del agente fijador. Este procedimiento se utiliza entre otros, por ejemplo, en la determinación de fenilalanina, galactosa y aminoácidos de cadena ramificada empleando métodos fluorométricos o colorimétricos.
- **Por acción física:** en esta segunda alternativa la fijación se realiza empleando un tratamiento térmico en autoclave durante 3 min a 110 °C, como ocurre en la determinación de aminoácidos por el método de inhibición bacteriana de Guthrie (14), en el cual después de la fijación, los analitos de interés difunden al medio de cultivo desde el disco impregnado con la sangre.

Independientemente de la forma en que se lleven a cabo la fijación y elusión de las muestras, este último proceso puede resultar afectado de manera sensible ya sea tanto por factores inherentes a las propias muestras como son la técnica de recolección y las condiciones de secado, transporte y conservación de las mismas, como por las variables que entran en juego a lo largo del proceso de elusión, determinando así que la eficiencia y el rendimiento del mismo resulten inferiores a lo esperable, dando lugar consecuentemente a resultados caracterizados por una subestimación del analito en cuestión.

Mayor imprecisión de los métodos de medida

En relación a este concepto debe resaltarse que si bien la mayoría de los métodos empleados en las pruebas de pesquisa cumplen con la exigencias de precisión requeridas para un método cuantitativo, el hecho de que las mismas se ejecuten sobre muestras de sangre entera colectadas en papel de filtro, que presentan una variabilidad intrínseca asociada con sus propias características y también una variabilidad adicional relacionada con los diferentes procedimientos a los cuales se hallan sujetas, determina que sea esperable que los métodos de pesquisa presenten una mayor imprecisión que los métodos que han sido diseñados para trabajar sobre muestras líquidas (7); y que los rangos de tolerancia a utilizar en cuanto a la máxima imprecisión admitida sean más amplios que en estos últimos casos.

Control de Calidad Interno

Introducción

Antes de comenzar con el desarrollo de los aspectos inherentes al control de calidad es importante hacer referencia a una premisa que aplica al control de calidad en todos los aspectos de los sistemas de salud, la cual establece que la calidad no es un producto de meras coincidencias sino que es el resultado de un ejercicio de planificación. Esto significa que el mejoramiento de la calidad de un sistema de trabajo no se va a producir espontáneamente y al azar, sino que por el contrario, para que esto ocurra, se deberá llevar a cabo la planificación de las actividades inherentes al sistema de calidad y fijar una estrategia a través de la cual va a ser posible acceder al mejoramiento buscado en la calidad.

Por otra parte también se debe destacar que la calidad no se trata de una propiedad a la cual se pueda acceder de forma gratuita, sino que para que ello ocurra se requiere una inversión que va a implicar mayores costos, pero que redundará en la prestación de un servicio calificado.

Se define al Control de Calidad como el conjunto de técnicas y actividades operativas que son utilizadas para cumplimentar los requerimientos de calidad (15), mientras que el Control de

Calidad Interno se define como el conjunto de procedimientos establecidos por el laboratorio para el monitoreo continuo del funcionamiento y los resultados de las medidas, a fin de decidir si dichos resultados son suficientemente confiables como para ser reportados (15).

En términos prácticos, el Control de Calidad Interno es un procedimiento en el que se lleva a cabo el análisis de muestras estables a efectos de verificar que el procedimiento analítico de medida está funcionando dentro de límites aceptables, siendo su objetivo asegurar la precisión requerida y detectar tendencias antes de que los procesos analíticos estén fuera de control (1).

De este modo, para garantizar que dicho objetivo pueda ser alcanzado exitosamente, el Control de Calidad Interno debe ser ejecutado en forma sistemática, tiene que estar perfectamente planificado, organizado y definido, es decir que no puede ser ejecutado al azar y de manera esporádica; y además debe estar apropiadamente documentado y contemplar la educación y el entrenamiento de todo el personal que va a estar afectado a la ejecución de las distintas pruebas de laboratorio (1).

Implementación de un sistema de Control de Calidad Interno en el laboratorio de Pesquisa Neonatal

Características de los materiales de control

- **Composición:** un requerimiento imprescindible en relación a la matriz de los materiales de control a utilizar es que la misma debe ser lo más similar posible a la de las muestras de recién nacidos (1), es decir que debe tratarse de sangre entera humana, con hematocrito ajustado al 50-55 % e impregnada en un papel de filtro de uso diagnóstico de las mismas características que el utilizado para la recolección de muestras y para la preparación de los calibradores.

A pesar de esto, y tal como ya fuera mencionado anteriormente cuando se hizo referencia a la naturaleza y composición de algunos calibradores, en la práctica es posible encontrar materiales de control cuyas matrices difieren notablemente de la matriz de una muestra de recién nacido, como se observa por ejemplo en aquellas preparaciones que utilizan glóbulos rojos de origen animal o en aquellas que emplean una solución de albúmina o solución fisiológica para sustituir al plasma humano (19).
- **Homogeneidad:** en cuanto a esta característica se requiere que los materiales de control sean suficientemente homogéneos de manera tal que su variabilidad intrínseca no contribuya sustancialmente a la variabilidad del sistema analítico, y por lo tanto esta propiedad debe ser validada previamente a su inclusión en la rutina diaria (1,16).
- **Estabilidad:** con la finalidad de garantizar una vida útil apropiada de los diferentes lotes de producción, se requiere que los materiales de control sean estables en las condiciones de trabajo diario (4 °C) y de almacenamiento prolongado (-20 °C) (1,16) en bolsas herméticas adicionadas de desecantes e indicadores de humedad.

Niveles de los analitos

Otro punto importante a considerar a fin de asegurar un óptimo desempeño del sistema de Control de Calidad Interno es que los materiales de control a utilizar deben cubrir todo el rango de concentraciones de interés clínico (1). De esta forma, en cada corrida se deberán incluir necesariamente al menos 3 niveles distintos de concentración -normal, borderline y elevado-, quedando la posibilidad de desdoblar a este último nivel en un control moderadamente elevado y en otro francamente elevado si existe disponibilidad de materiales de control apropiados.

Por otra parte, los diferentes materiales de control deberán ser procesados distribuidos a lo largo de toda la corrida y recibir un tratamiento idéntico al de las muestras de recién nacidos que se analicen a diario (1).

Eventualmente, los mismos podrán ser colocados en posiciones fijas y predeterminadas a efectos de que, en aquellos métodos que utilizan el formato de microplacas, permitan asegurar también la identidad de éstas últimas (16).

Fuentes de materiales de control

Es recomendable que para cada analito evaluado se utilicen materiales de control provenientes de al menos dos fuentes diferentes a fin de asegurar una máxima capacidad de detección de errores.

La implementación de un sistema de Control de Calidad Interno utilizando exclusivamente materiales de control de una única fuente y calibradores que reconocen un mismo origen representa un riesgo importante de error y por lo tanto su uso en la práctica está contraindicado (1). Esta recomendación responde al hecho de que, en general, tanto los controles como los calibradores provenientes de una misma fuente son preparados siguiendo idénticos protocolos de preparación, de manera tal que, ante un error en la asignación de valores a los calibradores, dichos controles no serán capaces de detectar el defecto de calibración antes mencionado.

Esta situación puede presentarse en la práctica tanto cuando se trabaja en forma exclusiva con materiales de control y calibradores provistos por equipos de reactivos comerciales, como cuando se trabaja exclusivamente con materiales de control y calibradores preparados en el propio laboratorio (16).

En la actualidad es posible acceder a materiales de control para Pesquisa Neonatal de al menos 3 fuentes diferentes:

- a) Materiales de control provistos como parte de los equipos de reactivos comerciales.
- b) Materiales de control provistos por Programas de Evaluación Externa de Calidad, como por ejemplo por el Newborn Screening Quality Assurance Program - Centers for Disease Control and Prevention de Atlanta – EE.UU. (4).
- c) Materiales de control preparados en el propio laboratorio.

Con respecto a esta última alternativa, es decir a la preparación de materiales de control en el propio laboratorio, y a pesar de que no se trata de un procedimiento complejo, en el caso de algunos analitos es muy difícil de concretar a consecuencia de la escasa disponibili-

dad de las fuentes de analitos necesarias para efectuar el enriquecimiento de dichos materiales y a costos accesibles.

Acciones de implementación

Para la implementación del Control de Calidad Interno en el laboratorio de Pesquisa Neonatal los materiales de control previamente seleccionados deben ser procesados a diario en un mínimo de 20 corridas analíticas sucesivas e independientes, se debe verificar gráficamente la simetría en la distribución de los puntos, calcular la media (X) y la mediana (M) a efectos de comprobar si dicha distribución es normal, y finalmente determinar el desvío estándar (DS) y el coeficiente de variación (CV) (1,17,18).

El valor obtenido de la media será función del valor verdadero del analito en estudio y de la inexactitud del método utilizado, mientras que el desvío estándar y el coeficiente de variación –por ser ambos parámetros dependientes tanto de la variabilidad del proceso analítico como de la homogeneidad de los materiales de control–, darán una idea de la imprecisión corrida a corrida del método de medida, o en otras palabras, de la presencia de errores aleatorios que pueden estar afectando al mismo, los cuales en la práctica pueden ser atribuidos a errores de pipeteo o medida, a un inconsistente mezclado de reactivos y muestras, o a la variabilidad de los instrumentos de medida, incubadores, centrifugas o tiempos de incubación (1).

En función de ésta última afirmación, para lograr una correcta interpretación de los resultados, resulta indispensable el registro de todas las condiciones de trabajo como reactivos, pipetas, instrumental, operador, temperaturas de incubación y lotes de calibradores y reactivos, concepto que refuerza la exigencia de que el Control de Calidad Interno tiene que estar apropiadamente documentado.

Finalmente, y como última exigencia a cumplimentar a efectos de poder dar inicio a la etapa de control propiamente dicha se requiere que el coeficiente de variación del método en uso se ajuste a las especificaciones de calidad previamente definidas (16), esto implica que si al momento de implementar el control de calidad interno los coeficientes de variación no cumplen con la especificaciones de calidad antes mencionadas, falló el procedimiento de validación de métodos o bien el método no ha sido validado y ha sido puesto en rutina sin una evaluación previa del mismo.

Seguimiento diario del control de calidad interno

El seguimiento diario del Control de Calidad Interno puede realizarse haciendo uso de 2 estrategias diferentes que permitirán verificar día a día que los métodos están funcionando en forma estacionaria y que no están sujetos a cambios bruscos no predecibles, posibilitando así mantener la consistencia analítica y eliminar cualquier tipo de subjetividad en la interpretación y evaluación de dicho desempeño analítico (1,16):

- **Cartas de Control de Levey-Jennings:** se trata de un sistema gráfico de seguimiento en el cual los resultados son expresados como número de desvíos estándar (NDS) (17).

La principal limitación de este tipo de sistema gráfico de seguimiento del Control de Calidad Interno, es que por tratarse de un sistema mínimo, las reglas de control definidas

poseen un poder estadístico limitado cuando son tomadas en forma individual y utilizando solamente un único material de control por corrida.

En razón de estas características, las mencionadas reglas presentan una baja sensibilidad para la detección de errores y una alta probabilidad de falsas alarmas, propiedades que sin lugar a dudas atentan en forma significativa contra la efectividad del sistema de control (16).

Por otra parte, debe destacarse que, si bien el uso de replicados de un único material de control incrementa la probabilidad de detectar errores aleatorios, esta medida tomada en forma aislada también incrementa la probabilidad de falsos rechazos.

En la práctica, para minimizar el número de falsos rechazos y maximizar la detección de errores, se deben analizar 2 o más materiales de control de diferentes concentraciones y por duplicado (1). Adicionalmente, una medida mucho más efectiva en tal sentido consiste en la implementación de un sistema de control Multi-Regla.

- **Sistema de Control Interno Multi-Regla de Westgard:** se trata de un sistema de seguimiento que permite llevar a cabo una optimización en la interpretación de los resultados del Control de Calidad Interno mediante la combinación de reglas de decisión seleccionadas que presentan una baja probabilidad de falsos rechazos y una alta probabilidad de detección de errores (19).

El sistema Multi-Reglas de Westgard es aplicable a sistemas de control con un mínimo de dos materiales de control por corrida, en el cual se combinan seis reglas que al ser analizadas permiten contar con una orientación acerca de si los errores detectados son de tipo sistemático o aleatorio (17-19)

Evaluación Externa de Calidad

Introducción

Se entiende por Evaluación Externa de Calidad al sistema diseñado para la comparación objetiva de los resultados obtenidos por los laboratorios participantes a través de una agencia externa, ya sea entre sí o con respecto a valores de referencia, y cuyo objetivo principal es establecer la exactitud (20).

A diferencia de lo que se observa en el caso de las Pruebas de Suficiencia (*Proficiency Testing*), las cuales están vinculadas con actividades de tipo regulatorias, de carácter punitivo y con consecuencias económicas, la Evaluación Externa de Calidad persigue un fin educativo tendiente a lograr la armonización de los laboratorios para una mejora global de la red de laboratorios.

En relación a los objetivos, y si bien como se mencionó anteriormente el objetivo principal de la Evaluación Externa de Calidad es establecer la exactitud, a través de la misma se persiguen también objetivos generales, comunes a cualquier tipo de laboratorio, y objetivos específicos, propios de los laboratorios de Pesquisa Neonatal (16), los cuales se detallan en la Tabla 19.

Tabla 19. Objetivos de la Evaluación Externa de Calidad

Objetivos generales
<ul style="list-style-type: none"> ● Establecer la exactitud ● Determinar el desempeño de los laboratorios participantes ● Detectar errores y establecer las posibles causas de los mismos
Objetivos específicos en Pesquisa Neonatal
<ul style="list-style-type: none"> ● Propiciar el mejor conocimiento de las mediciones ● Lograr la correcta expresión de los resultados ● Normatizar y unificar las terminologías utilizadas en la descripción y evaluación de los métodos y programas de Pesquisa Neonatal ● Asesorar a los participantes para la correcta interpretación de los resultados individuales y globales de la Evaluación Externa de Calidad ● Lograr el correcto entendimiento de los conceptos estadísticos utilizados tanto en la Evaluación Externa de Calidad como en el Control de Calidad Interno ● Promover la implementación de un sistema de Control de Calidad Interno

La participación activa en Programas de Evaluación Externa de Calidad permite realizar el seguimiento del desempeño de los métodos utilizados en la rutina diaria, verificar su estabilidad a largo plazo, y sacar conclusiones objetivas acerca de la comparabilidad de los resultados reportados por los Laboratorios participantes (1).

Como regla general, siempre resulta recomendable la participación en al menos un Programa de Evaluación Externa de Calidad para cada analito, y preferentemente en dos, a efectos de contar con una evaluación más objetiva del desempeño de los métodos en uso (16).

Las actividades de la Evaluación Externa de Calidad son complementarias a las actividades del Control de Calidad Interno, razón por la cual ambas constituyen dos piezas fundamentales e imprescindibles del sistema de Aseguramiento de la Calidad del laboratorio de Pesquisa Neonatal.

A continuación se presenta una breve descripción de los principales aspectos que hacen al funcionamiento de un Programa de Evaluación Externa de Calidad.

Características de los materiales de control

Como norma de aplicación general, los materiales de control provistos por los Programas de Evaluación Externa de Calidad deben ser lo más similar posible a las muestras de recién nacidos y deben cubrir todo el rango de valores clínicamente relevantes.

Por otra parte, y a efectos de poder llevar a cabo una correcta interpretación de los resultados obtenidos resulta fundamental que cada laboratorio participante cuente con información concreta acerca de la naturaleza y composición de la sangre utilizada para la preparación de los mismos, la fuente de los analitos empleados para realizar su enriquecimiento (1), el volu-

men de sangre empleado para obtener cada mancha, el hematocrito, el lote y marca del papel de filtro (9), la homogeneidad y estabilidad de los mismos, y los criterios utilizados para la asignación de los valores (1,16).

De estas exigencias se deduce que cuanto más significativas sean las diferencias entre las características de los calibradores y las muestras de los recién nacidos con respecto a los materiales de control provistos por los Programas de Evaluación Externa de Calidad, entonces más complejo y dificultoso será obtener conclusiones objetivas acerca del desempeño de los métodos evaluados a través de dichos Programas.

Modalidad de participación

Todos los materiales de control provistos por los Programas de Evaluación Externa de Calidad deben ser analizados por los operadores que habitualmente realizan las pruebas de rutina como parte de la carga diaria de trabajo del Laboratorio (1).

Una vez realizadas las pruebas, cada Laboratorio debe informar sus resultados tanto en forma cuali como cuantitativa al Programa de Evaluación Externa de Calidad, el cual efectuará una evaluación estadística con los resultados de todos los participantes.

En dicha evaluación, y dependiendo de las características del Programa, los resultados cuantitativos de cada laboratorio serán comparados con respecto al valor asignado utilizando un método de referencia, o con respecto al valor de la media o la mediana de consenso global y/o con respecto al valor de la media o la mediana de consenso de cada método agrupado por principio analítico, en tanto que los resultados cualitativos (interpretación clínica) serán comparados con la clasificación realizada por el propio Programa de Evaluación Externa de Calidad de acuerdo a la concentración esperable de cada analito en cada material de control (16).

A través del reporte de resultados generado por los Programas de Evaluación Externa de Calidad cada Laboratorio podrá comparar su desempeño con el del total de los participantes y con el de aquellos Laboratorios que emplean su mismo principio analítico, pudiendo así obtener información acerca de la confiabilidad de los métodos utilizados, del desempeño de los sistemas de calibración y del cumplimiento de los objetivos específicos de calidad analítica (1).

Los errores sistemáticos detectados ya sea tanto a través de la participación en Programas de Evaluación Externa de Calidad, como también a través de la revisión a largo plazo del Control de Calidad Interno, frecuentemente reconocen su origen en factores tales como la presencia de impurezas, asignación errónea de valores a los calibradores, funciones de calibración no lineales; o reactivos contaminados, inestables o mal preparados (1).

Por último se debe destacar que la simple participación en un Programa de Evaluación Externa de Calidad no es capaz de generar por sí misma una mejoría en el desempeño de un laboratorio sino que solamente a través de la implementación de un estricto sistema de Control de Calidad Interno sumado a la información recibida desde los Programas de Evaluación Externa de Calidad, cuyas actividades son complementarias a las de Control de Calidad Interno, más las actividades de resolución de problemas que sean ejecutadas por

parte del propio laboratorio permitirán alcanzar la mejoría esperada en el desempeño de los métodos analíticos (16).

Referencias

1. Slazyk WE and Hannon WH. "Quality Assurance in the Newborn Screening Laboratory" en "Laboratory Methods for Neonatal Screening", Therrell BL Ed, American Public Health Association, Washington, 23-46, 1993.
2. Westgard JO. "Defining Quality and Designing QC for Neonatal Screening" en Proceedings of QA/QC in Newborn Screening Workshop, Phoenix - Arizona, November 4, 2002. Disponible en www.westgard.com/qcapp18.htm.
3. CLSI. "Blood Collection on Filter Paper for Neonatal Screening Programs". Approved Standard – Sixth Edition. CLSI Document NBS01-A6, Wayne, PA. Clinical and Laboratory Standards Institute; 2013.
4. Newborn Screening Quality Assurance Program – Centers for Disease Control and Prevention. "2018 Annual Summary Report". Volume 36, 2018. Recuperado de https://www.cdc.gov/labstandards/pdf/nsgap/NSQAP_Annual_Summary_2018-508.pdf
5. Dhondt JL, Hannon WH, Torresani T and Webster D; "Summary of The Meeting Quality Assurance in Newborn Screening" en "New Horizons in Neonatal Screening". Farriaux JP and Dhondt JL Eds. Excerpta Medica, Amsterdam London, 379-382, 1994.
6. Slazyk WE, Phillips DL, Therrell BL and Hannon WH; "The Effect of Lot-to-Lot Variability in Filter Paper on the Quantification of Thyroxin, Thyrotropin, and Phenylalanine in Dried-Blood Specimens". Clin Chem 34, 53-58, 1988.
7. Webster D. "Quality Performance of Newborn Screening Systems: Strategies for Improvement". J Inherit Metab Dis, 30, 576-84, 2007.
8. Hall E, Flores S, De Jesus V, "Influence of Hematocrit and Total-Spot Volume on Performance Characteristics of Dried Blood Spots for Newborn Screening", Int. J. Neonatal Screen. 1, 69-78, 2015.
9. Adam BW, Alexander JR, Smith SJ, Chace DH, Loeber JG, Elvers LH and HannonWH. "Recoveries of Phenylalanine from Two Sets of Dried-Blood-Spot Reference Materials: Prediction from Hematocrit, Spot Volume, and Paper Matrix". Clin Chem 46, 126-8, 2000.
10. Holub M, Tuschl K, Ratschmann R, Strnadová KA, Mühl A, Heinze G, Sperl W and Bodamer OA. "Influence of Hematocrit and Localization of Punch in Dried Blood Spots on Levels of Amino Acids and Acylcarnitines Measured by Tandem Mass Spectrometry". Clin Chim Acta 373, 27-31, 2006.
11. George RS, Moat SJ, "Effect of Dried Blood Spot Quality on Newborn Screening Analyte Concentrations and Recommendations for Minimum Acceptance Criteria for Sample Analysis", Clin Chem, 62 (3), 466-475, 2016.

12. Borrajo GJC, Pistaccio LG y Mazziotta D. "Evaluación de Homogeneidad en Materiales de Control para Pesquisa Neonatal". (Poster). *Acta Bioquim Clin Latinoam*, 38, 403, 2004.
13. Aldis B, Hoffman G and Therrell BL. "Laboratory Methods for Phenylalanine Analysis on Newborn Screening Specimens" en "Laboratory Methods for Neonatal Screening", Therrell BL Ed, American Public Health Association, Washington, 47-75, 1993.
14. Guthrie R and Susi A. "A Simple Phenylalanine Method for Detecting Phenylketonuria in Large Populations of Newborn Infants". *Pediatrics* 32, 338-43, 1963.
15. Eurachem Guide. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". First English Edition 1.0, 1998. www.eurachem.org/guides/valid.pdf
16. Borrajo GJC y Mazziotta D. "Control de Calidad en Programas de Pesquisa Neonatal", en "Errores Innatos en el Metabolismo del Niño". Colombo M, Cornejo V y Raimann E Editores. 4ª Edición. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, 529-554, 2016.
17. Mazziotta D y Corrêa JA. "Control de Calidad" en "Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico", Fernández Espina C y Mazziotta D Eds. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas, 371-407, 2005.
18. Clinical and Laboratory Standards Institute. "Statistical Quality Control for Quantitative Measurement Procedures: Principles and Definitions"; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document C24-A3, Vol 26 N° 25, 2006.
19. Westgard JO, Barry PL, Hunt MR and Groth TA. "A Multi-Rule Shewhart Chart for Quality Control". *Clin Chem* 27, 493-501, 1981.
20. ISO-REMCO N231, 1991.

CAPÍTULO 7

Sistema integral de control de calidad

Introducción

La implementación de un Sistema Integral de Control de Calidad para un programa de Pesquisa Neonatal es un proceso que se sustenta en la aplicación de una serie de conceptos muy frecuentemente utilizados en el área de salud entre los cuales se incluyen Calidad, Control de Calidad, Aseguramiento de la Calidad, Gestión de Calidad, Sistema de Gestión de Calidad y Sistema Integral de Gestión de Calidad.

En función de esto, y a efectos de lograr una mejor y más simple comprensión de los principios y fundamentos teóricos requeridos, dichos conceptos serán definidos a continuación en forma detallada.

- **Calidad:** es el conjunto de características de un producto o servicio que le confieren al mismo la aptitud necesaria para satisfacer e, incluso superar, las necesidades y expectativas del cliente o usuario (1,2).
- **Control de Calidad:** es el conjunto de técnicas y actividades operativas que son utilizadas para cumplimentar los requerimientos de calidad (1). En otros términos se puede decir que el Control de Calidad es la parte de la Gestión de Calidad orientada a examinar y conocer el grado de cumplimiento de los requisitos establecidos o requeridos por los procesos, productos o servicios del laboratorio (2), y dado que el mismo se realiza al final de cada uno de estos procesos es de naturaleza reactiva.
- **Aseguramiento de la Calidad:** es el conjunto de acciones planeadas y sistemáticas incluidas en el sistema de calidad, necesarias para proporcionar confianza de que se cumplen los requisitos de calidad determinados o exigidos (1-3).
El Aseguramiento de la Calidad es también una parte de la Gestión de Calidad (2), y dado que el mismo se aplica durante cada uno de los procesos, es de naturaleza preventiva o proactiva.
- **Gestión de Calidad:** es el conjunto de actividades necesarias para el control, aseguramiento y mejora de la calidad de acuerdo con la política de calidad y las responsabilidades fijadas en el Sistema de Gestión de Calidad (2).

- **Sistema de Gestión de Calidad:** es la estructura organizativa establecida para regir y actualizar el conjunto de responsabilidades, procesos, acciones y recursos que exige la Gestión de Calidad (2).
- **Sistema Integral de Gestión de Calidad:** es el conjunto de medios, recursos y actividades del Sistema de Gestión de Calidad integrados en la organización, estructura y gestión del Laboratorio (2).

De este modo, cuando el concepto de Aseguramiento de la Calidad es aplicado a un programa de Pesquisa Neonatal, “proporcionar confianza de que se cumplen las condiciones de calidad exigidas por las necesidades del usuario” implica que el mencionado programa debe asegurar tanto la detección como el tratamiento oportuno y apropiado de todos los individuos afectados, y también garantizar el desarrollo de cada uno de ellos con sus capacidades físicas, psíquicas e intelectuales intactas a lo largo de toda su vida.

En consecuencia, toda vez que se hace referencia al concepto de Calidad aplicado a la Pesquisa Neonatal -y a semejanza de lo que ocurre en prácticamente todas las actividades del área de la salud-, el mismo no debe quedar estrictamente circunscripto o limitado a la etapa analítica del Laboratorio, sino que por el contrario debe ser mucho más amplio y abarcativo, involucrando también a las etapas pre y post-analíticas (4-6).

Esta exigencia no resulta un hecho casual sino que, por el contrario, la misma surge como una consecuencia directa de que la única forma posible de garantizar un óptimo desempeño de cada uno de los efectores involucrados en los distintos niveles de ejecución de un programa de Pesquisa Neonatal es a través de la implementación de un Sistema de Control de Calidad de alcance integral, actividad que en definitiva redundará en una máxima eficacia y eficiencia del sistema de pesquisa en su conjunto¹³.

Por las razones antes expuestas, y a efectos de que todo programa de Pesquisa Neonatal pueda dar cumplimiento a las condiciones de calidad exigidas, resulta necesario que cada uno de ellos evalúe su eficacia y eficiencia en forma continua y permanente a lo largo del tiempo, ya sea tanto en lo que se refiere a su desempeño global como también en lo que respecta al desempeño específico de cada uno de sus efectores, puesto que, sólo de esta forma, será posible determinar cuál es la contribución de cada uno de ellos al cumplimiento de los objetivos generales.

En la práctica, la concreción de estos objetivos es un proceso complejo que requiere de 3 elementos fundamentales:

- a) El monitoreo permanente de la calidad del sistema por parte de los responsables del mismo (5,7-8).
- b) El esfuerzo cooperativo de todos los efectores involucrados en los distintos niveles de ejecución (8).
- c) La disponibilidad de los datos e información aportados por cada uno de ellos.

¹³ La eficacia es un concepto que expresa la relación entre los resultados obtenidos y los objetivos predeterminados, mientras que la eficiencia es un concepto que expresa la relación entre los resultados obtenidos y los medios utilizados para ello (2).

Elementos a considerar en el diseño de un Sistema Integral de Control de Calidad para Pesquisa Neonatal

El proceso de diseño y desarrollo de un Sistema Integral de Control de Calidad para Pesquisa Neonatal requiere definir en primera instancia quienes serán los efectores del sistema, cuáles serán sus alcances y responsabilidades, y cuáles serán los índices o indicadores que han de ser utilizados a efectos de poder cuantificar el desempeño de cada uno de ellos en forma puntual, el de los diferentes niveles de ejecución, y el del propio programa en su conjunto.

Efectores del sistema de Pesquisa Neonatal

Los efectores del sistema de Pesquisa Neonatal están representados por el conjunto de instituciones, organizaciones, servicios o equipos de trabajo responsables de ejecutar las tareas inherentes al programa de Pesquisa Neonatal en sus diferentes niveles de ejecución. Los mismos pueden ser agrupados en 4 categorías:

Centros Asistenciales

Son los encargados de ejecutar las siguientes tareas (4, 9-11):

- Instrucción, educación y provisión de información correcta y actualizada a los padres.
- Aseguramiento de que todos los recién nacidos son pesquisados.
- Obtención de consentimientos o disentimientos informados en aquellos casos en los que los mismos sean requeridos.
- Recolección de muestras de sangre satisfactorias y envío de las mismas al laboratorio de pesquisa en tiempo y forma.
- Recepción de resultados y entrega de informes de resultados a los padres.
- Implementación inmediata de las acciones de localización de aquellos neonatos con muestras inadecuadas, incumplimiento de condiciones preanalíticas o resultados anormales, ya sea para la toma de una segunda muestra o para su derivación a un centro de atención especializada.

Esta categoría de efectores, a los cuales habitualmente se conoce con el nombre de “efectores de recolección de muestras”, está representada por maternidades públicas y privadas, hospitales, clínicas, sanatorios, unidades sanitarias y laboratorios de análisis clínicos, siendo los responsables de la ejecución de las tareas asignadas a la misma todos aquellos integrantes del equipo de salud que se encuentran en el entorno del recién nacido en el momento del nacimiento, y también aquellas personas afectadas al cuidado del mismo durante el período neonatal.

Como se desprende de los conceptos expresados anteriormente las responsabilidades asignadas a este grupo de efectores comienzan con el nacimiento de un niño o con el ingreso

del mismo a un centro asistencial, y culminan una vez que se recibe y documenta el resultado de las pruebas de pesquisa en los registros médicos del paciente (4).

En relación al procedimiento de recolección de muestras resulta importante dedicarle un párrafo aparte, puesto que cada uno de los responsables a cargo de dicho procedimiento en los diferentes centros asistenciales debe asegurar que las muestras de sangre sean colectadas de acuerdo con las normas o recomendaciones establecidas por el propio programa y que, además, estas muestras se ajusten a los requerimientos de calidad exigidos en cuanto a sus características, uniformidad, impregnación y volumen de sangre por mancha (6,12).

Por otra parte, estos efectores también son responsables de asegurar que los datos demográficos de todos los recién nacidos sean completados de manera correcta, puesto que un inadecuado llenado de los mismos puede conducir a dificultades y/o errores tanto en el análisis e interpretación de los resultados, como en la localización del propio recién nacido (6-7,10).

Laboratorio de pesquisa

Es el encargado de ejecutar las siguientes tareas (4, 9-11):

- Documentación precisa de todas las actividades que involucran muestras de sangre de recién nacidos.
- Definición y puesta en práctica de criterios de recolección de muestras.
- Educación de los efectores de recolección de muestras.
- Análisis de muestras de sangre de todos los recién nacidos y reporte de resultados en forma oportuna.
- Comunicación a los centros asistenciales y al centro de atención especializada de los datos de todos aquellos recién nacidos que requieren su localización.
- Comunicación de las directivas e indicaciones pertinentes en relación a la conducta a seguir con aquellos recién nacidos que requirieron su derivación al centro de atención especializada.
- Almacenamiento de datos y registros.
- Implementación y documentación de un apropiado sistema de Aseguramiento de Calidad.
- Seguimiento de la llegada de segundas muestras solicitadas por resultados anormales o por recolección inadecuada.

Esta segunda categoría de efectores está representada por laboratorios centralizados, altamente desarrollados y especializados en Pesquisa Neonatal, siendo los responsables de la ejecución de sus tareas el personal administrativo, técnicos de laboratorio y bioquímicos que forman parte de la planta de recursos humanos de los mismos.

Las responsabilidades del laboratorio de pesquisa comienzan con la recepción de las muestras de sangre de los recién nacidos y culminan cuando todas las pruebas han sido completadas, los resultados reportados y el control de calidad documentado; los resultados anormales o de muestras insatisfactorias han sido apropiadamente comunicados a los responsables de ejecutar las acciones de localización (4); las segundas muestras solicitadas han sido recibidas, analizadas y reportadas; y los neonatos referidos al centro de atención especializada han con-

currido a los mismos. Eventualmente en aquellos casos en los cuales se han completado y agotado todas las instancias de seguimiento definidas por el programa con resultados negativos, las responsabilidades culminan documentando apropiadamente las acciones realizadas.

Centro de Atención Especializada

Es el encargado de las siguientes tareas (4, 9-11):

- Confirmación diagnóstica en niños con resultados anormales.
- Implementación inmediata del tratamiento.
- Tratamiento y seguimiento a largo plazo de los neonatos afectados.
- Comunicación de la información final del diagnóstico a los centros asistenciales y al médico pediatra encargado de la atención general del paciente.
- Evaluación de la efectividad de las acciones terapéuticas implementadas.
- Coordinación centralizada de las acciones de localización de los recién nacidos que así lo requieran.
- Provisión de resultados para la evaluación del funcionamiento del programa a largo plazo.

En general, los centros de atención especializada están representados por instituciones de alta complejidad, especializadas y capacitadas para llevar a cabo el diagnóstico de las enfermedades en cuestión, siendo los responsables de las tareas que les competen diferentes integrantes del equipo de salud entre los que se incluyen bioquímicos, médicos especializados en el manejo de las diferentes enfermedades congénitas pesquisadas, genetistas, nutricionistas, psicólogos y asistentes sociales.

Las responsabilidades del centro de atención especializada comienzan con la recepción de la comunicación de que un recién nacido con resultados anormales en las pruebas de pesquisa ha sido referido al mismo, y finalizan con la documentación de que el diagnóstico ha sido confirmado o descartado y de que, en aquellos casos en que corresponda, está siendo tratado (4).

Sistema de Transporte

Es el encargado de las siguientes tareas:

- Retiro de muestras de sangre de los recién nacidos en los diferentes centros asistenciales.
- Traslado y entrega de las mismas en el laboratorio de pesquisa.
- Transporte de informes de resultados y del material de trabajo necesario para la continuidad del programa desde el laboratorio de pesquisa hacia los diferentes centros asistenciales.

Tal como ya fuera definido en el Capítulo 2, este sistema de transporte puede presentar diferentes características dependiendo de lo establecido por cada programa y, en consecuencia, y en función de estas características variarán los responsables de las tareas que le competen.

Las responsabilidades del mismo comienzan cuando las muestras de sangre correspondientes a un determinado centro asistencial fueron recepcionadas para su transporte y culminan una vez que las mismas han sido entregadas en el laboratorio de pesquisa.

Indicadores de desempeño

En términos generales los índices o indicadores de desempeño pueden ser definidos como información seleccionada y asociada a un fenómeno determinado, destinada a observar periódicamente la evolución de dicho fenómeno con respecto a objetivos periódicamente establecidos (13).

A través de estos indicadores es posible conocer el nivel de calidad inicial de un proceso, fijar los objetivos de un modo cuantitativo, medir la eficacia de las soluciones adoptadas, monitorear la evolución de los resultados conseguidos, verificar si se han podido alcanzar los objetivos planteados y, en caso de que los resultados sean satisfactorios, incorporar las soluciones antes mencionadas al Sistema de Gestión de Calidad y monitorear las mismas a lo largo del tiempo (13).

A los fines prácticos, resulta una condición necesaria que los indicadores de desempeño presenten las siguientes características (13):

- a) simples en cuanto a la factibilidad de recolección de datos, elaboración, cálculo y comprensión.
- b) aceptables y creíbles.
- c) pertinentes y específicos, es decir capaces de ofrecer un dato cuantitativo que refleje claramente la evidencia que se pretende controlar y únicamente para la variable que se está evaluando.
- d) reproducibles, esto es que sean capaces de reproducir a lo largo del tiempo, los valores de una medida realizada en condiciones idénticas.
- e) fiables, veraces y precisos.

Indicadores de desempeño de un programa de Pesquisa Neonatal

La implementación de un Sistema Integral de Control de Calidad para un programa de Pesquisa Neonatal es un proceso que requiere no solamente la selección de indicadores apropiados que reflejen de manera cierta y objetiva el funcionamiento del mismo, sino también el diseño de un plan adecuado de Aseguramiento de la Calidad y la confección de un Manual de Calidad.

Hablando específicamente de los diferentes indicadores de desempeño a utilizar, la mayor parte de ellos, excepto aquellos que estiman la eficiencia del tratamiento y del seguimiento a largo plazo, pueden ser determinados a partir de la información de cada recién nacido y de los resultados de los análisis correspondientes que se encuentran disponibles en el laboratorio de Pesquisa. De este modo, y de acuerdo al tipo de información que ofrece cada uno de ellos, los diferentes indicadores pueden ser clasificados en al menos 6 categorías, las cuales se describen a continuación:

- **Indicadores que estiman la cobertura:**
 - Número de recién nacidos evaluados.
 - Número de nacidos vivos.
 - Tasa de cobertura: $[(\text{Número de recién nacidos evaluados} / \text{Número de nacidos vivos}) \times 100]$.

- **Indicadores que estiman el cumplimiento del marco de tiempo óptimo establecido para cada etapa:**
 - Edad de recolección de muestras: [Fecha de toma de muestra – Fecha de nacimiento].
 - Tiempo de tránsito de las muestras al laboratorio: [Fecha de ingreso al laboratorio – Fecha de toma de muestra].
 - Frecuencia de envíos de muestras al laboratorio.
 - Tiempo de análisis: [Fecha de análisis – Fecha de ingreso al laboratorio].
 - Edad de primera consulta al centro de atención especializada: [Fecha de consulta – Fecha de nacimiento].
 - Edad de diagnóstico e inicio de tratamiento: [Fecha de inicio de tratamiento – Fecha de nacimiento].
- **Indicadores que estiman la calidad de las muestras:**
 - Número y porcentaje de muestras satisfactorias.
 - Número y porcentaje de muestras insatisfactorias.

Con respecto a éste último índice, el mismo resulta de la evaluación de diversos aspectos inherentes a las muestras de sangre, razón por la cual es habitual que el mismo sea desglosado en los diferentes componentes que contribuyen al mismo, a saber:

 - a) Porcentaje de muestras con llenado incompleto de datos demográficos.
 - b) Porcentaje de muestras con calidad inapropiada de recolección: volumen, uniformidad, grado de impregnación del papel, hemólisis, presencia de coágulos, exposición a agentes potencialmente interferentes, secado, etc.
 - c) Porcentaje de muestras que no cumplen con las condiciones preanalíticas de recolección establecidas: tiempos mínimos y máximos recomendados de recolección, tiempo mínimo de ingesta de leche previo a la toma de muestras, administración de corticoides, etc.
- **Indicadores que estiman la eficiencia del sistema de detección:**
 - Prevalencia de cada una de las patologías pesquisadas.
 - Tasa de falsos negativos.
 - Sensibilidad.
 - Tasa de falsos positivos.
 - Especificidad.
 - Tasa de recitación.
 - Valor predictivo positivo.
- **Indicadores que estiman la eficiencia de las acciones de seguimiento en el corto plazo:**
 - Número de segundas muestras solicitadas según analito y causa (ya sea por recolección inadecuada, incumplimiento de condiciones preanalíticas o por resultados anormales).

- Número de segundas muestras recibidas con sus respectivos tiempos de recolección, tránsito y análisis.
- Número de recién nacidos derivados al centro de atención especializada para confirmar o descartar el diagnóstico.
- Número de recién nacidos que concurren al centro de atención especializada.
- **Indicadores que estiman la eficiencia del tratamiento y seguimiento a largo plazo:**
 - Indicadores de morbilidad específicos para cada enfermedad: coeficiente de desarrollo/coeficiente intelectual, número y duración de las hospitalizaciones, porcentaje con complicaciones específicas, etc.
 - Indicadores de cumplimiento del tratamiento: adherencia a los monitoreos de laboratorio, adherencia a las consultas preestablecidas por el centro responsable del tratamiento y seguimiento, registros de dietas.
 - Indicadores de resultados a largo plazo y funcionalidad: escolaridad alcanzada, empleo, adaptación psicosocial, posibilidades de éxito reproductivo (4,8).

Como conclusión, la implementación de un Sistema de Gestión de Calidad para un programa de Pesquisa Neonatal va a permitir detectar el tipo y la magnitud de los errores que se están cometiendo, detectar aquellos efectores que requieren asistencia, establecer el impacto de las acciones educativas y de asesoramiento, optimizar el desempeño de los distintos efectores y maximizar la eficacia y eficiencia del programa en su conjunto.

Referencias

1. Eurachem Guide. "The Fitness for Purpose of Analytical Methods. A Laboratory Guide to Method Validation and Related Topics". First English Edition 1.0, 1998. www.eurachem.org/guides/valid.pdf
2. Fernández Espina C. "Introducción a la Calidad: Conceptos Generales" en "Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico", Fernández Espina C y Mazziotta D Eds. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas, 1-26, 2005.
3. Fernández Espina C. "El aseguramiento de la Calidad en el Laboratorio Clínico". Acta Bioquím Clín Latinoam, 33, 49-67, 1999.
4. International Atomic Energy Agency. "Quality Assurance for the Newborn Screening System" en "Screening of Newborns for Congenital Hypothyroidism. Guidance for Developing Programs". International Atomic Energy Agency Ed., Vienna, 45-66, 2005.
5. International Atomic Energy Agency. "Basic Aspects in the Screening of Newborns with Emphasis on the Detection of Hypothyroidism" en "Screening of Newborns for Congenital Hypothyroidism. Guidance for Developing Programs". International Atomic Energy Agency Ed., Vienna, 21-41, 2005.

6. Torresani T. "Quality Control Requirements in Neonatal Screening". *Eur J Pediatr* 162, S54-S56, 2003.
7. Therrell BL, Panny SR, Davidson A, Eckman J, Hannon WH, Henson MA, Hillard M, Kling S, Levy HL, Meaney FJ, McCabe ERB, Mordaunt V, Pass K, Shapira E and Tuerck J. "U.S. Newborn Screening System Guidelines: Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services". *Screening* 1, 135-47, 1992.
8. Pass KA, Lane PA, Fernhoff PM, Hinton CF, Panny SR, Parks JS, Pelias MZ, Rhead WJ, Ross SI, Wethers DL and Elsas LJ. "U.S. Newborn Screening System Guidelines II: Follow-up of Children, Diagnosis, Management, and Evaluation Statement of the Council of Regional Networks for Genetic Services (CORN)". *Journal of Pediatrics* 137, S1-S46, 2000.
9. Tuerck JM, Buist NR, Skeels MR, Miyahira RS and Beach PG. "Computerized Surveillance of Errors in Newborn Screening Practices". *American Journal of Public Health*, 77, 1528-31, 1987.
10. Webster D, Dhondt JL, Hannon WH, Loeber G and Torresani T. "Quality Assurance and Standardization: Summary of the Satellite Meeting, Turku, Finland, 11-12 June 1999". *Acta Paediatrica*, Suppl 432, 7-12, 1999.
11. Tuerck JM, Steiner RD, LaFranchi SL, Thomas G, Skeels MR, Hermerath AC and Rien L. "The Norwest Regional Newborn Screening Program Practitioner's Manual". 7th Edition. 2004. <http://www.dhs.state.or.us/publichealth/nbs/index.cfm>
12. Slazyk WE and Hannon WH. "Quality Assurance in the Newborn Screening Laboratory" en "Laboratory Methods for Neonatal Screening", Therrell BL Ed, American Public Health Association, Washington, 23-46, 1993.
13. Fernández Espina C. "Seguimiento y Mejora Continua de la Calidad" en "Gestión de la Calidad en el Laboratorio Clínico". Fernández Espina C y Mazziotta D Eds. Editorial Médica Panamericana, Buenos Aires-Bogotá-Caracas, 167-196, 2005.

El autor

Gustavo JC Borrajo

Doctor de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata (UNLP) Area Ciencias Biológicas. Bioquímico, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Profesor Adjunto Cátedra de Bioquímica Patológica, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Profesor de la Materia Optativa Pesquisa Neonatal de Enfermedades Congénitas, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP. Director del Laboratorio de Detección de Errores Congénitos, Fundación Bioquímica Argentina, La Plata. Jefe del SubPrograma de Evaluación Externa de Calidad para Pesquisa Neonatal, Fundación Bioquímica Argentina, La Plata. “Current Status of Newborn Screening Worldwide: 2015”, Seminars in Perinatology 2015. “Newborn Screening for Phenylketonuria: Latin American Consensus Guidelines”. Journal of Inborn Errors of Metabolism and Screening, 2016. “Control de Calidad en Programas de Pesquisa Neonatal”, en “Errores Innatos en el Metabolismo del Niño”. Colombo M, et al. 4ª Edición. Editorial Universitaria. Santiago de Chile, 2016. Galardonado con el “Robert Guthrie Award 2015” por la International Society for Neonatal Screening.

Borrajo, Gustavo Juan Carlos

Pesquisa neonatal / Gustavo Juan Carlos Borrajo. - 1a ed. - La Plata : Universidad Nacional de La Plata ; EDULP, 2021.

Libro digital, PDF/A - (Libros de cátedra)

Archivo Digital: descarga

ISBN 978-950-34-1967-0

1. Salud. 2. Enfermedades del Recién Nacido. 3. Diagnóstico. I. Título.
CDD 618.9201

Diseño de tapa: Dirección de Comunicación Visual de la UNLP

Universidad Nacional de La Plata – Editorial de la Universidad de La Plata

48 N.º 551-599 / La Plata B1900AMX / Buenos Aires, Argentina

+54 221 644 7150

edulp.editorial@gmail.com

www.editorial.unlp.edu.ar

Edulp integra la Red de Editoriales Universitarias Nacionales (REUN)

Primera edición, 2021

ISBN 978-950-34-1967-0

© 2021 - Edulp

e
exactas


Edulp
EDITORIAL DE LA UNLP



UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA