

GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS

— Practicanato Preparatorio –
Bioquímica



Universidad
Nacional
de Córdoba

PLAN DE ACCIONES Y HERRAMIENTAS PARA PREVENIR, ATENDER Y SANCIONAR LAS VIOLENCIAS DE GÉNERO EN EL ÁMBITO DE LA UNC

Si viviste una situación de violencia o discriminación por razones de género, existen espacios en la universidad donde podés acercarte en un marco de respeto, gratuidad y confidencialidad.

Te compartimos un resumen de los puntos principales del Plan de Acciones de la Universidad Nacional de Córdoba que comprende herramientas para prevenir, sancionar y erradicar las violencias de género en el ámbito de la universidad.

Si estás interesada/o en obtener más información y materiales para compartir con tus compañeras/os podés acercarte a la SAE de la Facultad.

¿Cuál es el plan?

Este Plan de Acciones fue aprobado por el Honorable Consejo Superior (HCS) de la UNC en el año 2015 (Resolución N° 1011/15). Este surge a partir de la necesidad de la UNC, de trabajar comprometidamente en la promoción de acciones concretas para construir una vida libre de discriminación y violencias, además de fomentar la inclusión de todas las personas que integran la comunidad universitaria.

1. Objetivo del Plan:

Promover en la comunidad universitaria un ambiente libre de violencias de género y discriminación de cualquier tipo por razones de género y/o identidad sexual.

2. Destinatarias/os:

Toda la comunidad universitaria, docente, nodocentes y estudiantes, de pregrado, grado, posgrado, de oficios y de los diferentes programas de la UNC; investigadoras/es, becarias/os o egresadas/os, vinculadas/os a la Universidad mediante beca, adscripción, equipo de investigación o extensión, y que pertenezcan en su condición a cualquiera de las unidades académicas, colegios preuniversitarios o dependencias de la UNC, incluyendo museos, hospitales, bibliotecas, observatorios, Área Central, Complejo Vaquerías y Campo Escuela. Como asimismo personas que presten servicios en los ámbitos de la UNC.

3. Líneas de Acción:

- Prevención: sensibilización, capacitación, información e investigación.
- Sistematización de información y estadísticas.
- Intervención institucional ante situaciones o casos de violencia de género.

4. Principios rectores de la atención a personas afectadas por violencias de género:

- a. Gratuidad
- b. Respeto
- c. Confidencialidad

d. Contención

e. No revictimización

f. Diligencia y celeridad

5. ¿Ante qué situaciones puedo consultar?

a) Uso de palabras escritas u orales que resulten discriminatorias, hostiles, humillantes u ofensivas para quien las reciba.

b) Agresiones físicas, acercamientos corporales u otras conductas físicas y/o sexuales, indeseadas u ofensivas para quien los recibe.

c) Requerimientos sexuales que impliquen promesas implícitas o expresas de un trato preferencial respecto de la situación actual o futura de estudio/trabajo, proyecto de investigación o extensión, de quien las recibe.

d) Requerimientos sexuales que impliquen amenazas, implícitas o expresas, que provoquen daños o castigos referidos a la situación, actual o futura, de empleo, estudio, utilización o participación en un servicio administrativo, proyecto de investigación o acción social, de quien la recibe.

e) Hechos de violencia sexual descritos bajo la rúbrica «Delitos contra la Integridad Sexual» ubicados en el Libro Segundo, Título III del Código Penal argentino, denominados «abuso sexual simple», «abuso sexual calificado», «abuso sexual con acceso carnal» o los que en el futuro pudieren tipificarse.

f) Hechos de violencia sexual no descritas en los términos del artículo 119 y sus agravantes del Código Penal argentino y que configuren formas de acoso sexual.

g) Acoso sexual: todo comentario reiterado o conducta con connotación sexual que implique hostigamiento y/o asedio que tenga por fin inducir a otra persona a acceder a requerimientos sexuales no deseados o no consentidos.

Estos son algunos ejemplos de situaciones, aunque **NO limitan otras situaciones** que pudieran generarte incomodidad y dificultar tu vida universitaria, las que tendrán que ser analizadas en su particularidad.

6. Consultas y denuncias:

Las denuncias deben ser realizadas en la oficina del Plan, por la persona interesada o por alguien con conocimiento directo de los hechos, tomando un primer contacto en forma personal, telefónica, o por correo electrónico. Serán receptadas por personas capacitadas para ello. Se garantizará un espacio físico adecuado para mayor privacidad. Será respetado el hecho de que por alguna causa la persona denunciante prefiere que otras personas no estén presentes, y se tramitará acompañamiento psicológico a las personas denunciantes que así lo requieran.

La persona que denuncia deberá exponer las circunstancias, lugar, tiempo, partícipes y todo elemento que pueda conducir a la comprobación del hecho. Se conformará un acta de denuncia donde conste fecha, nombre y apellido, documento y domicilio de la persona que denuncia así como la declaración efectuada y las pruebas testimoniales o documentales si las hubiere. El acta

será leída en voz alta y firmada por todas las personas partícipes en el acto. En el caso que la persona denunciante lo considere la denuncia podrá ser ampliada. En caso de realizarse una denuncia, ésta será remitida a la Fiscalía Permanente de la UNC para que inicie una investigación.

7. Régimen sancionatorio:

En caso de que se determinara culpable de ejercer cualquier tipo de violencia a la o las personas acusadas, se sancionaran según consignan los artículos del punto 5 del Plan de Acciones, en acuerdo con lo establecido por el reglamento de investigaciones administrativas aprobado por el Honorable Consejo Superior de la UNC.

En el caso de que la sanción sea aplicada a uno o más estudiantes, se respetará su derecho a la educación establecido en la declaración 8/2009 de Derechos Estudiantiles.

En todos los casos, la reincidencia se considerará un agravante y se atenderán a las circunstancias de tiempo, lugar y modo para el encuadramiento de la conducta.

Contactos:

Oficina del Plan de Acciones – Violencias de género en el ámbito de la UNC

De lunes a viernes, en horarios por la mañana y por la tarde.

Sede DASPU de Ciudad Universitaria; Consultorio 129, primer piso.

WhatsApp: 351 652 1473

Tel.: 0351 – 5353629

Correo electrónico: violenciasdegenero@rectorado.unc.edu.ar

ESPACIOS DE GÉNERO EN LA FCQ

- **Sistema “Yarken”- Espacio de consulta de la FCQ ante situaciones de violencias de género y discriminación por motivos de género u orientación sexual-**

La generación de este espacio se enmarca en la RHCS N° 994/22, en la que la Unidad Central de Políticas de Género de la UNC, dispuso la implementación del Sistema “Yarken” en todas las Unidades Académicas y Colegios Preuniversitarios de la UNC, el cual tiene como objetivo relevar y registrar consultas referidas a las situaciones de violencias de género y/o discriminación por motivos de género, así como también los datos sociodemográficos, las estrategias de abordaje, y el seguimiento de tales situaciones.

Las estrategias de abordaje se enmarcan en el Plan de Acciones y Herramientas para Prevenir, Atender y Sancionar las Violencias de Género en el ámbito de la UNC

Correo electrónico: generofcq@quimicas.unc.edu.ar

Día de atención: **jueves de 13 a 17 h. Facultad de Ciencias Químicas;
Planta Baja, Sala de Reuniones 1 (al lado del HCD).**

- **Comisión Interclaustros de Feminismos y Género, CIfeG.**

CIfeG es un ESPACIO de PARTICIPACIÓN ABIERTO que busca contribuir activamente a visibilizar y fortalecer la perspectiva de géneros en la Institución a través de distintas acciones que significan la promoción de un ambiente LIBRE DE VIOLENCIAS en nuestra Facultad. Desde su creación en el año 2017 busca instalar la temática de igualdad de géneros tanto desde lo simbólico, en prácticas concretas que erradiquen las prácticas violentas, como desde lo académico fomentando espacios de formación con perspectiva de género. Buscamos trabajar como un espacio de conversación y planificación de actividades. Invitamos a TODAS/IS a participar en este espacio comunicándose a los contactos que figuran más abajo.

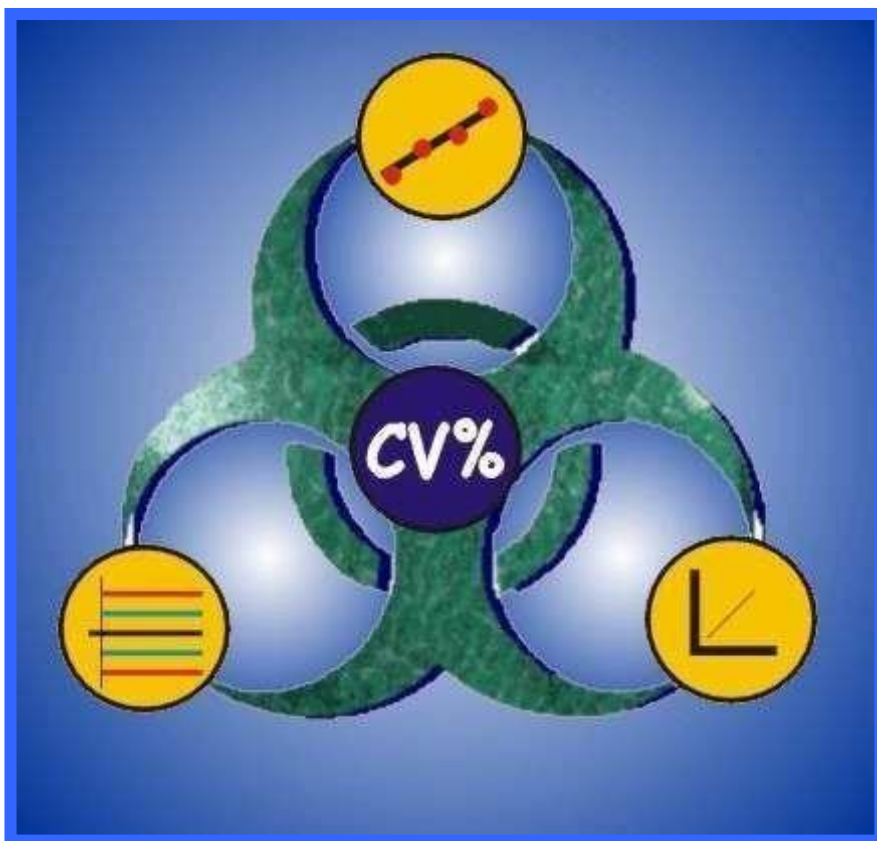
@cifegfcq cifeg@quimicas.unc.edu.ar / cifegfcqunc@gmail.com www.fcq.unc.edu.ar/cifeg

DATOS ÚTILES DE CONTACTO

La consulta en la FCQ o la denuncia realizada en el Plan de Acciones de la UNC no excluye la realización de otras consultas y/o denuncias en:

- Línea 144. Línea gratuita. Atención las 24 horas, los 365 días del año.
- Línea 0800 888 9898. Línea gratuita. Atención las 24 horas, los 365 días del año.
- Unidades Judiciales de distrito.
- Unidad Judicial de Violencia Familiar de la provincia de Córdoba.
- Secretaría de Lucha contra la Violencia a la Mujer y Trata de Personas (Polo Integral de la Mujer). Calle Entre Ríos 680, ciudad de Córdoba. Tel.: 0351-4288700/01; WhatsApp: 3518141400.
- Centro Integral de Varones. Rondeau 258, ciudad de Córdoba. Tel.: 0351-4342188/89; WhatsApp: 3513070929.

**GUÍA DE TRABAJOS PRÁCTICOS
PRACTICANATO PREPARATORIO
BIOQUÍMICA**



**DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA CLÍNICA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
AÑO 2023**



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
República Argentina

"2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria"

EXP-UNC: 0062365/2018

VISTO:

La Resolución HCS 1011/15 - Plan de acciones y herramientas para prevenir, atender y sancionar las violencias de género.

La Resolución Rectoral 2574/2016 "Plan de Acciones y Herramientas para prevenir, atender y sancionar las Violencias de Género en el ámbito de la UNC".

La Ordenanza HCS 9/11 - Identidad de Género- (facilitar el acceso de las personas trans a los derechos relacionados con el reconocimiento de la identidad elegida o auto-percibida).

La Resolución HCD 1197/2017 "Creación de la Comisión Interclaustrados de Feminismos y Géneros de la Facultad de Ciencias Químicas (CIFEg)".

CONSIDERANDO:

Que tanto las Áreas de Salud y de Ciudadanía Estudiantil de la Secretaría de Asuntos Estudiantiles, el Programa de Género de la Secretaría de Extensión Universitaria; los Centros de estudiantes de distintas unidades académicas y las propias unidades académicas han receptado situaciones de acoso y hostigamiento sexual sufrido por estudiantes en el ámbito de la Universidad Nacional de Córdoba.

Que no obstante el camino transitado, persisten invisibilizaciones acerca de que la discriminación y violencias de género atraviesan a todas las personas integrantes de nuestra comunidad universitaria, por lo que es imprescindible arbitrar los mecanismos institucionales necesarios para sensibilizar a la comunidad.

Que es necesario difundir en toda la comunidad universitarias el Plan de acciones y herramientas para prevenir, atender y sancionar las violencias de género en el ámbito de la UNC.

Que la CIFEg tiene como uno de sus objetivos contribuir en la divulgación e implementación del Plan de acciones y herramientas para prevenir, atender y sancionar las violencias de género en el ámbito de la UNC.

Que los programas de difusión del Plan de acciones, incluyendo los realizados en esta Facultad se han concentrado inicialmente en actividades de sensibilización docentes y no docentes.

Que resulta imprescindible que el claustro estudiantil, que es especialmente susceptible a situaciones de violencia derivadas de por la



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
República Argentina

"2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria"

EXP-UNC: 0062365/2018

expresión o ejercicio de la identidad de género, puede conocer el Plan de Acciones mediante material de acceso cotidiano.

Que la recepción de las guías de estudio y trabajos prácticos de las Asignaturas de esta Facultad es centralizada por Secretaría Académica y su impresión gestionada en conjunto por el Centro de Estudiantes.

Que la mayoría de las Asignaturas de esta Facultad cuentan con Aulas Virtuales en la plataforma Moodle que facilitan la interacción y el intercambio de información entre las/os Alumnas/os y las/os Docentes responsables.

Lo propuesto por la CIfEG de esta Facultad.

Lo aconsejado por la Comisión de Enseñanza y Vigilancia y Reglamento de esta Facultad.

**EL H. CONSEJO DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
RESUELVE:**

Artículo 1º: Incorporar al inicio de todas las guías de estudio y/o de trabajos prácticos de las Asignaturas de esta Facultad el documento de información sobre el "Plan de Acciones y Herramientas para prevenir, atender y sancionar las Violencias de Género en el ámbito de la UNC" y sobre la CIfEG que obran en los Anexos I y II de la presente resolución.

Artículo 2º: Solicitar a los profesores responsables de todas las asignaturas que incorporen entre el material disponible en las Aulas Virtuales el documento de información sobre el "Plan de Acciones y Herramientas para prevenir, atender y sancionar las Violencias de Género en el ámbito de la UNC" y sobre la CIfEG que obran en los Anexos I y II de la presente resolución.

Artículo 3º: Protocolícese. Inclúyase en el Digesto Electrónico de la UNC. Comuníquese y archívese.

**DADA EN LA SALA DE SESIONES DEL HONORABLE CONSEJO
DIRECTIVO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS DE LA
UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA A CATORCE DÍAS DEL MES DE
DICIEMBRE DEL AÑO DOS MIL DIECIOCHO.**

RESOLUCIÓN Nº:
MP/ss

1260

Prof. Dra. SILVIA G. CORREA
SECRETARÍA GENERAL
Facultad de Ciencias Químicas - UNC



Prof. Dr. MARCELO M. MARISCAL
VICEDECANO
Facultad de Ciencias Químicas - UNC



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
República Argentina

"2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria"

EXP-UNC: 0062365/2018

ANEXO I (Res HCD **1260** /18)

**Plan de Acciones y Herramientas para prevenir, atender y sancionar las
Violencias de Género en el ámbito de la UNC**

Si viviste una situación de violencia o discriminación por razones de género, existen espacios en la universidad donde podés acercarte en un marco de respeto, gratuidad y confidencialidad.

La Comisión Interclaustró de Feminismos y Géneros (CIfEG) de la Facultad de Ciencias Químicas, comparte un resumen de los puntos principales del Plan de Acciones de la Universidad Nacional de Córdoba que comprende herramientas para prevenir, sancionar y erradicar las violencias de género en el ámbito de la universidad.

Si estás interesadx en obtener más información y materiales para compartir con tus compañerxs podés acercarte a la SAE de la facultad.

¿Cuál es el plan?

Este Plan de Acciones fue aprobado por el Honorable Consejo Superior (HCS) de la UNC en el año 2015 (Resolución N° 1011/15). Se basa en las nuevas leyes e investigaciones que nuestro país y la UNC han producido en los últimos años: Ley Nacional N° 26.485; Declaración de Derechos Estudiantiles; Ordenanza de respeto a la Identidad de Género Autopercibida, entre los avances en materia de ampliación de derechos humanos. Es importante que conozcas tus derechos y las herramientas con que contás para defenderlos. ¡Compartí con tus compañerxs esta información!

1. **Objetivo del Plan:** Promover en la comunidad universitaria un ambiente libre de violencias de género y discriminación de cualquier tipo por razones de género y/o identidad sexual.
2. **Destinatarixs:** Toda la comunidad universitaria, docente, no docentes y estudiantes, de pregrado, grado, posgrado, de oficios y de los diferentes programas de la UNC; investigadorxs, becarixs o egresadxs, vinculadxs a la Universidad mediante beca, adscripción, equipo de investigación o extensión, y que pertenezcan en su condición a cualquiera de las unidades académicas, colegios preuniversitarios o dependencias de la UNC, incluyendo museos, hospitales, bibliotecas, observatorios, Área Central, Complejo Vaquerías y Campo Escuela. Como asimismo personas que presten servicios en los ámbitos de la UNC.

3. **Lineas de Accion:**

- Prevención: sensibilización, capacitación, información e investigación.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
República Argentina

"2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria"

EXP-UNC: 0062365/2018

- Sistematización de información y estadísticas.
- Intervención institucional ante situaciones o casos de violencia de género.

Principios rectores de la atención a personas afectadas por violencias de género:

- a. Gratuidad
- b. Respeto
- c. Confidencialidad
- d. Contención
- e. No revictimización
- f. Diligencia y Celeridad

Situaciones o casos de violencias de género:

- a. Uso de palabras escritas u orales que resulten discriminatorias, hostiles, humillantes u ofensivas para quien las reciba.
- b. Agresiones físicas, acercamientos corporales u otras conductas físicas y/o sexuales, indeseadas u ofensivas para quien las reciba.
- c. Requerimientos sexuales que impliquen promesas implícitas o expresas de un trato preferencial respecto a la situación actual o futura de estudio/trabajo, proyecto de investigación o extensión, de quien las recibe.
- d. Requerimientos sexuales que impliquen amenazas, implícitas o expresas, que provoquen daños o castigos referidos a la situación, actual o futura, de empleo, estudio, utilización o participación en un servicio administrativo, proyecto de investigación o acción social, de quien la recibe.
- e. Hechos de violencia sexual descritos bajo la rúbrica "Delitos contra la Identidad Sexual" ubicados en el Libro Segundo, Título III del Código Penal argentino, denominados "abuso sexual simple", "abuso sexual calificado", "abuso sexual con acceso carnal" o los que en el futuro pudieren tipificarse.
- f. Hechos de violencia sexual no descritas en los términos del artículo 119 y sus agravantes del Código Penal argentino y que configuran formas de acoso sexual.
- g. Acoso sexual: todo comentario reiterado o conducta con connotación sexual que implique hostigamiento y/o asedio que tenga por fin inducir a otra persona a acceder a requerimientos sexuales no deseados o no consentidos. Las situaciones presentes no limitan otras que pudieran surgir y tendrán que ser analizadas en su particularidad.

Consultas y denuncias: Deben ser realizadas en la oficina del Plan, por la persona interesada o por alguien con conocimiento directo de los hechos, en forma personal, telefónica, o por correo electrónico. Serán receptadas por



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
República Argentina

"2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria"

EXP-UNC: 0062365/2018

personas capacitadas para ello. Se garantizará un espacio físico adecuado para la privacidad de las personas. Será respetado el hecho de que por alguna causa la persona denunciante prefiere que otras personas no estén presentes. y se tramitará apoyo psicológico a las personas denunciantes, si así lo requieran.

La persona que denuncia deberá exponer las circunstancias, lugar, tiempo, partícipes y todo elemento que pueda conducir a la comprobación del hecho. Se conformará un acta de denuncia donde conste fecha, nombre y apellido, documento y domicilio de la persona que denuncia así como la declaración efectuada y las pruebas testimoniales o documentales si las hubiere. El acta será leída en voz alta y firmada por todas las personas partícipes en el acto. En el caso que la persona denunciante lo considere la denuncia podrá ser ampliada.

En caso de realizarse una denuncia, ésta será remitida a la Fiscalía Permanente de la UNC para que inicie una investigación.

IMPORTANTE:

- Es responsabilidad de todas las personas que tomen conocimiento por situaciones de violencia de género la derivación y el acompañamiento a la Oficina del Plan.
- La denuncia realizada allí no limita o excluye de la realización de una denuncia en unidades judiciales de distrito, en la línea gratuita o en la unidad judicial de violencia familia de la provincia de Córdoba.

Régimen sancionatorio: En caso de que se determinara culpable de ejercer cualquier tipo de violencia a la o las personas acusadas, se sancionaran según consignan los artículos del punto 5 del Plan de Acciones, en acuerdo con lo establecido en la Ordenanza del Honorable Consejo Superior 9/12 y su texto ordenado aprobado por Resolución Rectoral 204/2016.

En el caso de que la sanción sea aplicada a unx o más estudiantes, se respetará su derecho a la educación establecido en la declaración 8/2009 de Derechos Estudiantiles.

En todos los casos, la reincidencia se considerará un agravante y se atenderán a las circunstancias de tiempo, lugar y modo para el encuadramiento de la conducta.



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
República Argentina

"2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria"

EXP-UNC: 0062365/2018

¿Dónde realizar consultas y/o denuncias?

**Comisión Interclaustrado de Feminismos y Géneros (CIfEG) de la
Facultad de Ciencias Químicas.**

Correo electrónico: cifegfcqunc@gmail.com, genero@fcq.unc.edu.ar

Oficina del Plan:

Consultorio 133, planta alta - Sede DASPU de Ciudad Universitaria.

Atención:

- Lunes y Miércoles de 15 a 18 hs.
- Martes y Jueves de 9 a 12 hs.

Tel. 0351-5353629

Correo electrónico: violenciasdegenero@extension.unc.edu.ar



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
República Argentina

"2018 - Año del Centenario de la Reforma Universitaria"

1260 EXP-UNC: 0062365/2018
ANEXO I (Res HCD 48)

¿Sabías que existe una comisión de feminismos y géneros en la facu?



La **Comisión Interclaustró de Feminismos y Géneros (CIfEG)** de la Facultad de Ciencias Químicas es un espacio de participación abierto y de construcción colectiva: cualquier persona dentro de la facu puede sumarse a nuestras reuniones.

Tenemos como objetivo promover un ambiente de respeto hacia la diversidad y las disidencias sexuales, libre de violencias de género y discriminación de cualquier tipo. Para contactarnos, podés escribirnos un mail a:



genero@fcq.unc.edu.ar o cifegfcqunc@gmail.com



Comisión Interclaustró de Feminismos y Géneros - FCQ

¡Te esperamos!

Datos Útiles:

- Secretaría de Lucha contra la Violencia a la Mujer y Trata de Personas (Polo de la Mujer): Entre Ríos 680, Córdoba. Teléfono: **(0351)4288700/01**
- Centro de Atención Integral para varones: Rondeau 258, Córdoba. Teléfono: **(0351) 4342188/9**



Universidad
Nacional
de Córdoba

ARTÍCULO 2 – ESTATUTO DE LA UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

“Misión de la Universidad. La Universidad, como institución rectora de los valores sustanciales de la sociedad y el pueblo a que pertenece, tiene los siguientes fines:

- a. La educación plena de la persona humana;
- b. La formación profesional y técnica, la promoción de la investigación científica, el elevado y libre desarrollo de la cultura y la efectiva integración del hombre en su comunidad, dentro de un régimen de autonomía y de convivencia democrática entre profesores, estudiantes y graduados;
- c. La difusión del saber superior entre todas las capas de la población mediante adecuados programas de extensión cultural;
- d. Promover la actuación del universitario en el seno del pueblo al que pertenece, destacando su sensibilidad para los problemas de su época y las soluciones de los mismos;
- e. Proyectar su atención permanente sobre los grandes problemas y necesidades de la vida nacional, colaborando desinteresadamente en su esclarecimiento y solución;”

Profesores Responsables:

Prof. Dra. Sánchez, Ma. Cecilia

Prof. Dr. Bonacci, Gustavo

Prof. Dr. Barcelona, Pablo

Auxiliares Docentes:

Bioq. Esp. Hemat. Collino, César J. G.

Dr. Ferrer, Darío G.

Dra. Subirada Caldarone, Paula V.

Dra. Vaglianti, Ma. Victoria

Bioq. Esp. Quim. Clinica Lujan, Pablo

Bioq. Gutierrez, Ma. Victoria

Bioq. Fernandez Yamila

Bioq. Tovo Albana

EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS CUANTITATIVOS

Objetivos de la Actividad Práctica

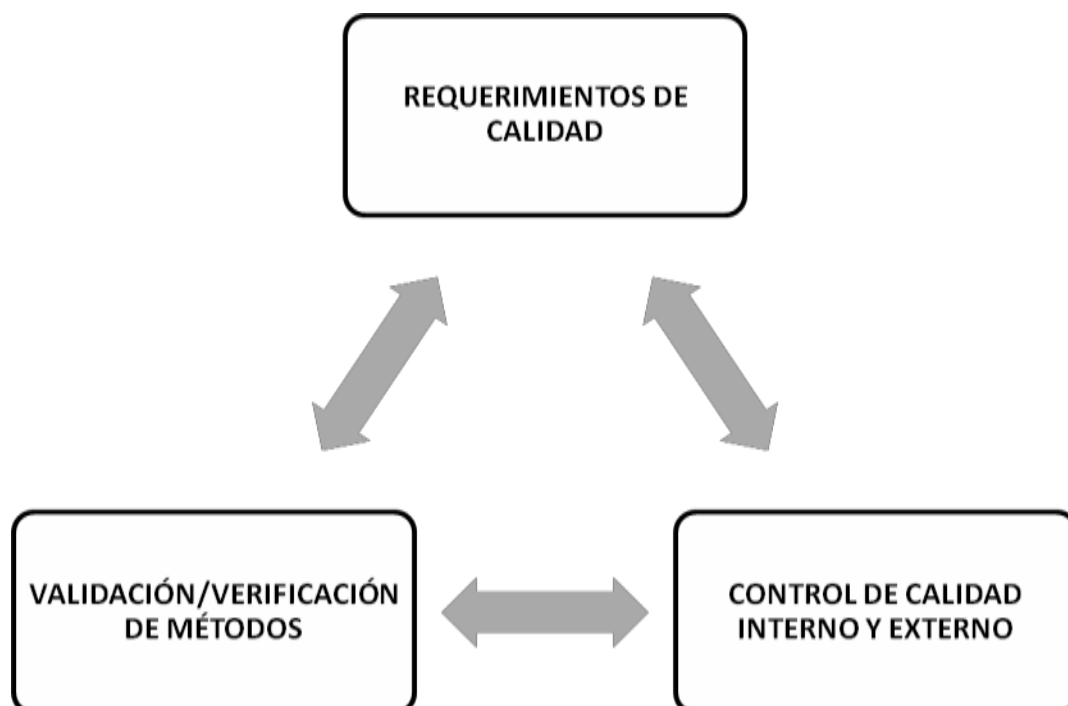
El propósito de esta actividad práctica es:

- i) Validar y/o verificar la precisión del método en estudio,
- ii) Verificar el cumplimiento de las especificaciones de linealidad estipuladas por el fabricante,
- iii) Validar y/o Verificar la Veracidad (en término de Bias) del método.
- iv) Calcular el Error Total del método analítico para establecer la aceptabilidad en función de los distintos niveles de decisión médica requeridos para cada analito, y
- v) Diseñar cartas de control de calidad interno.

Aspectos generales de la Evaluación de Métodos

La medición de un analito de interés clínico en un fluido biológico humano involucra tres etapas fundamentales: a) pre-analítica, b) analítica, y c) post-analítica. Cada una de estas etapas cuenta con organigramas propios y ejecutan protocolos de funcionamiento claramente definidos a través de procedimientos escritos referidos con aspectos operativos y de control. Este tipo de organización constituye la base de lo que en la actualidad se conoce como Sistema General de Calidad, y desde la óptica de un laboratorio bioquímico permite obtener resultados confiables tanto en lo analítico como en lo clínico.

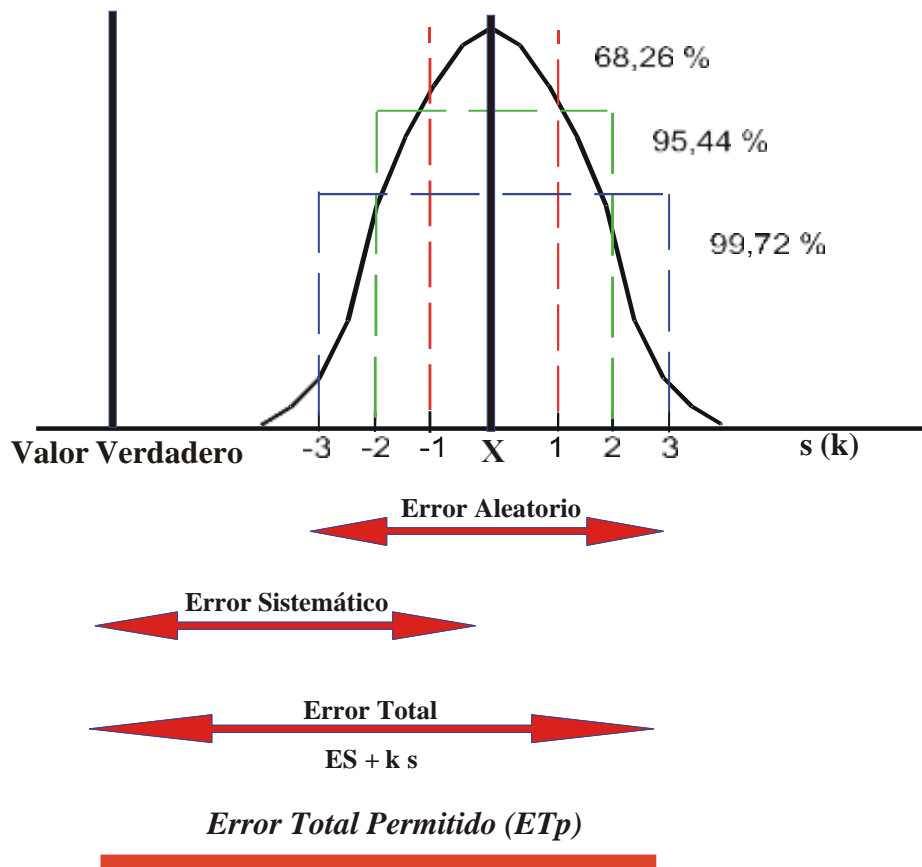
La etapa analítica involucra el proceso de medición del analito a través de la aplicación de un método (o ensayo), el cual también sigue un procedimiento operativo y de control establecido. La seguridad analítica de un método está supeditada a tres aspectos íntimamente relacionados entre sí, los Requerimientos de Calidad, la Validación y/o Verificación de Métodos, y el Control de Calidad Interno y Externo. En la siguiente figura se detalla la interrelación triangular de estos tres aspectos en el sentido de que la ejecución de un aspecto es dependiente de los otros dos aspectos y que la modificación de uno de ellos implicará la revisión y/o modificación de los otros dos:



Requerimientos de Calidad:

Son considerados estándares de calidad para parámetros analíticos, principalmente definidos en términos de precisión y veracidad. La aceptabilidad analítica puede ser definida en términos del Error Total permitido (ETp), cuya magnitud es dependiente del nivel de decisión médica (decisión diagnóstica, pronóstica y terapéutica) así como de la variabilidad biológica intraindividual y grupal del analito. Diferentes orígenes de información pueden ser usados para establecer los Requerimientos de Calidad. Una de las más difundidas en el ámbito internacional, son las especificaciones de errores permitidos por el *Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988 (USA-CLIA '88)* y el *European Biologic Goals and Calculated Biologic Allowable Total Errors* (<http://www.westgard.com>).

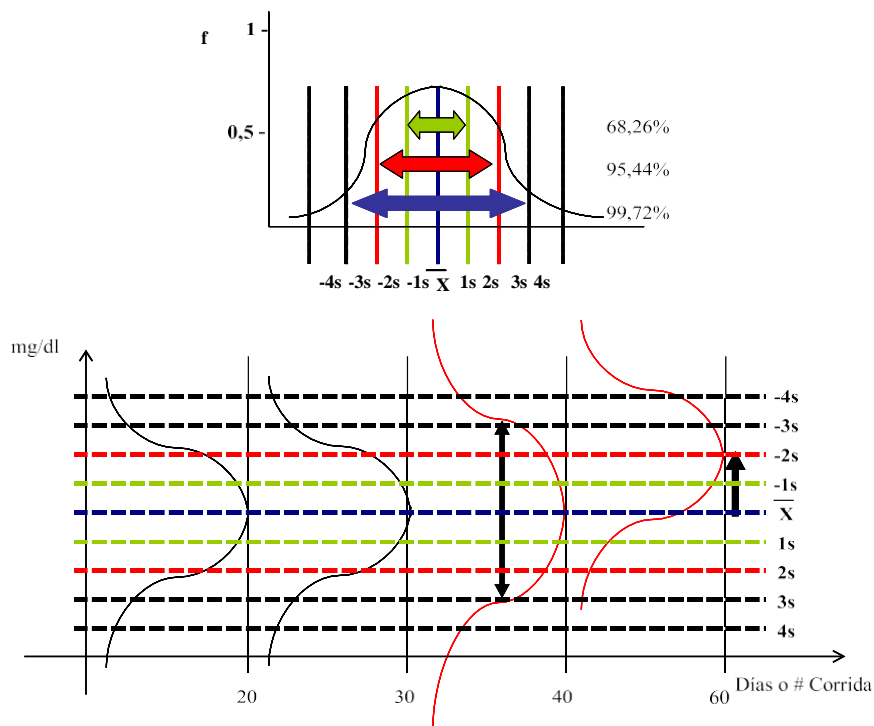
En definitiva los Requerimientos de Calidad determinan la magnitud aceptable que debe tener la medición de un analito referido con el error aleatorio o imprecisión (desviación estándar, s) y el error sistemático o veracidad (bias) así como la combinación de ambos errores analíticos o Error Total (ET). La siguiente figura define el Error Total basado en la combinación de la imprecisión y el Bias de un método:



De la figura se deduce que el Error Total define el máximo corrimiento de una medición respecto a un valor considerado como Verdadero o Conocido; por ende, el valor de ET expresa el nivel máximo de corrimiento que puede tener una medición cuando los valores de imprecisión y bias fueron previamente establecidos a través de la Validación y/o Verificación de Métodos.

Control de calidad interno y externo:

Una vez que el método es aceptable en comparación a lo establecido con los Requerimientos de Calidad, es fundamental demostrar que esta calidad analítica se mantiene en el tiempo en valores de imprecisión e inexactitud también aceptables. Es decir, el método se ejecuta rutinariamente de manera estable. En términos estadísticos, la estabilidad de un método se traduce en el mantenimiento de la campana de Gauss en el tiempo tal como lo establece la siguiente figura:



De la figura también se deduce que la pérdida de estabilidad analítica, ya sea por causa aleatoria o sistemática, se traducirá en una modificación de la campana de Gauss. Este comportamiento gausseano de la estabilidad analítica de un método constituye la base del CONTROL DE CALIDAD INTERNO a partir de la construcción de las Cartas de Control o Levey - Jenning. De este comportamiento estadístico y del nivel de distribución central de los datos se establecen las reglas controles que permiten establecer, con una determinada probabilidad asociada, la ocurrencia de errores no permitidos durante la ejecución rutinaria de un método.

Del mismo modo, a partir de que el laboratorio establece que el método es aceptable en términos de precisión y veracidad requiere conocer el grado de coincidencia con otros laboratorios. Esta comparación inter laboratorio se conoce como CONTROL DE CALIDAD EXTERNO y permite establecer el nivel de inexactitud de un laboratorio en particular en relación con otros laboratorios y en relación con valores de concentración de analitos que son considerados como Verdaderos, ya sea porque fueron establecidos por consenso, o porque representan la media de las mediciones inter laboratorio, o porque derivan de Materiales de Referencia Certificados (MRC), o porque fueron obtenidos con Métodos de mayor jerarquía analítica.

Validación y verificación de métodos:

Primero es importante definir la diferencia entre Validación y Verificación de Métodos. A priori, ambos términos tienen un alto nivel de coincidencia en cuanto a lo que definen, dado que tanto la Validación como la Verificación determinan la magnitud de los parámetros analíticos de un método. Sin embargo, en la práctica se diferencian. En términos generales, se considera que la Validación de Métodos es realizada por los fabricantes de reactivos para uso diagnóstico con el propósito de demostrar que sus métodos cumplen con los Requerimientos de Calidad del analito a medir. En cambio, la Verificación de Métodos es realizada por el laboratorio bioquímico con el propósito de demostrar que el reactivo o equipo adquirido reproduce los parámetros analíticos informados por el fabricante. No obstante, las estrategias experimentales que emplea el fabricante y el laboratorio bioquímico para Validar y Verificar son básicamente las mismas. La siguiente tabla

muestra el tipo de experimento que es aplicado en la Validación/Verificación de Métodos con el propósito de conocer, en este caso, el valor de imprecisión y bias así como el cálculo del Error Total. En esta tabla también se presentan algunos criterios que son aplicados para juzgar la aceptabilidad de los errores estimados en los diferentes experimentos de validación/verificación:

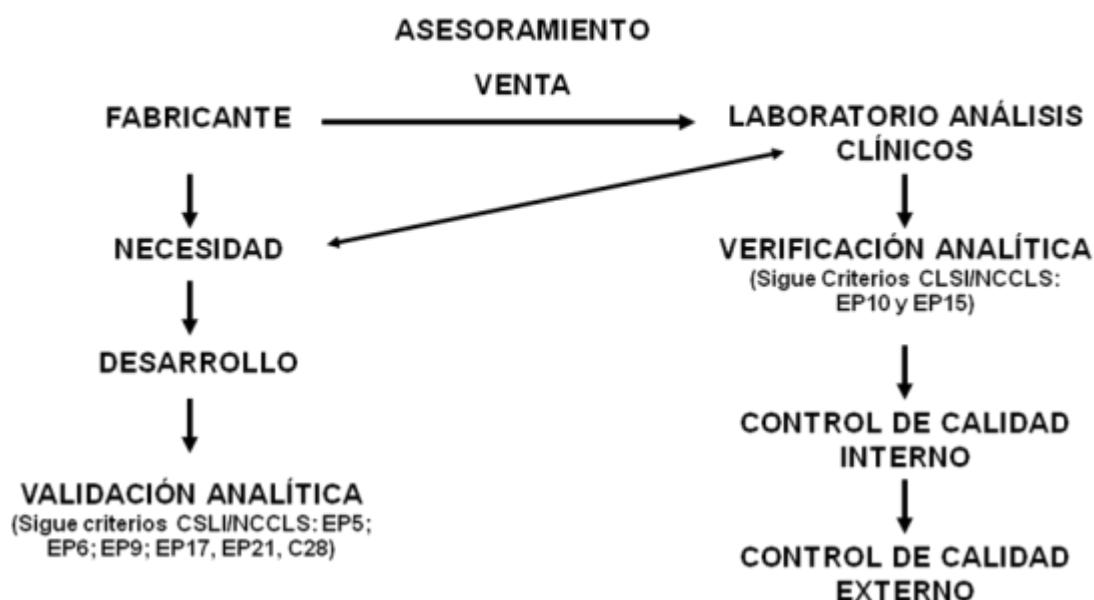
Tipo de Error	Experimento	Criterio
Error Aleatorio (precisión)	Replicación	$s_o \leq s_p$; o $4 \cdot s_o \leq E_{tp}$
Error Sistemático Proporcional	Recuperación	$\left \frac{100 - \%R}{100} \right \cdot X_c \leq B_p$
Error Sistemático Constante	Interferencia	$[Bias] \leq B_p$
Error Sistemático	Comparación de métodos	$[(a+bX_c)-X_c] \leq B_p$
Error Total (ET)	Replicación y comparación	$4 \cdot s_o + [(a+bX_c)-X_c] \leq E_{tp}$

Nota: **s_o** : desviación estándar determinada en experimentos de replicación; **R** : recuperación promedio (en porcentaje) determinado en experimentos de recuperación; **Bias (diferencia entre el valor medido y el valor real)**: diferencia promedio determinado en experimentos de interferencia; **a y b**: ordenada al origen y pendiente, respectivamente, determinado por análisis de regresión usando datos de comparación de métodos; **X_c** : concentración crítica relacionada con el nivel de decisión médica; **s_p , B_p y E_{tp}** : desviación estándar permitida, bias permitido y error total permitido, respectivamente.

Tietz, Textbook of Clinical Chemistry, 1994

Es importante destacar, que los valores de imprecisión (en término de **s**) obtenidos por el laboratorio bioquímico en la Evaluación de Métodos serán los utilizados como límites de seguridad en las cartas de Control de Calidad Interno. Además, estos valores, en conjunto con el Bias, serán utilizados en el cálculo del Error Total y en las Cartas de Especificaciones Operativas de Calidad u OSPec Charts. El siguiente gráfico representa los niveles de utilización de la Validación y Evaluación de Métodos por parte del fabricante y el laboratorio:

ESQUEMA DE DESARROLLO E IMPLEMENTACIÓN DE EQUIPOS DIAGNÓSTICOS PARA USO IN VITRO EN LABORATORIOS DE ANÁLISIS CLÍNICOS



La Validación/Verificación de Métodos incluye los siguientes parámetros analíticos: Imprecisión, Bias, Linealidad, Rango Analítico, Calibración, Sensibilidad, Límite de Detección, Límite de Cuantificación y Robustez, entre otros, estableciendo para cada caso el nivel de aceptabilidad siempre en referencia con los Requerimientos de Calidad. No obstante, en Química Clínica, el mayor énfasis es puesto en la Precisión, Linealidad, y la Veracidad, puesto que constituyen los parámetros analíticos más relevantes que definen, como fuera mencionado, la aceptabilidad y estabilidad analítica de un método durante la ejecución rutinaria. En este sentido, y debido a la diversidad existente en la bibliografía nacional e internacional referida a la Evaluación de Métodos, la Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI), anteriormente NCCLS, ha establecido guías para la Validación y Verificación de Métodos, las cuales fueron diseñadas con el propósito de uniformar criterios experimentales y estadísticos de aplicación directa para la Validación y Verificación de Métodos. Estas Guías se identifican con las siglas EP y son el resultado del consenso mundial logrado por un alto número de consultas de expertos pertenecientes a centros prestigiosos universitarios y laboratorios de la salud.

En el esquema anterior se observa que las Guías recomendadas para la Validación en los Fabricantes son diferentes a las recomendadas en la Verificación para los Laboratorios. A continuación se detallan las guías de CLSI con sus respectivos títulos recomendados para fabricantes y laboratorios, respectivamente:

a) Fabricantes:

EP5-A2: *Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods*: Este documento proporciona una guía para diseñar un experimento para evaluar la precisión de un equipo diagnóstico en química clínica.

EP6-A: *Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures*: Este documento proporciona una guía para evaluar la linealidad de un método de medición cuantitativa.

EP9-A2: Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. Este documento proporciona a los fabricantes (y bioquímicos de laboratorios clínicos) una guía para diseñar un experimento para evaluar el Bias entre dos métodos que miden el mismo analito. Idealmente, un método test debe ser comparado con un método de referencia o definitivo.

EP17-A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantification.

EP21-A: Estimation of Total Analytical Error for Clinical Laboratory Methods

C28: How to Define and Determine Reference Intervals in the Clinical Laboratory.

b) Laboratorios:

EP10-A: Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods. Este documento proporciona una guía para diseñar experimentos y análisis de datos para la evaluación preliminar de la ejecución analítica de un método.

EP15-A2: User Verification of Performance for Precision and Trueness. Este documento describe la verificación de la precisión y veracidad de un método de interés en química clínica utilizando un protocolo diseñado para ser completado en cinco días (o menos) de trabajo.

Definiciones

Existe un importante número de información bibliográfica sobre el uso de terminologías y definiciones de parámetros analíticos, que en muchas ocasiones resultan de difícil interpretación y aún contradictorias. Por lo tanto, a continuación se presentan algunas de las definiciones y terminologías que con mayor frecuencia se utilizan en un laboratorio bioquímico clínico, las cuales fueron extraídas de las diferentes Guías CLSI.

Analito: Componente representado en el nombre de una cantidad medible. NOTA: a) Esto incluye algún elemento, ion, compuesto, sustancia, factor, agente infeccioso, célula, organela, actividad (enzimática, hormonal, o inmunológica), o propiedad, presencia o ausencia, concentraciones actividad, intensidad, u otras características de las cuales van a ser determinadas; b) En el tipo de cantidad “masa de proteína en orina de 24 h”, “proteína” es el analito. En “cantidad de glucosa en plasma”, “glucosa” es el analito. En ambos casos, la totalidad de la frase representa el Medirando (ISO 17511); c) En el tipo de cantidad “concentración catalítica de la Isoenzima 1 de Lactato deshidrogenasa en plasma”, “Isoenzima 1 de Lactato deshidrogenasa” es el analito (ISO 18153).

Aseguramiento de la calidad analítica (AQA): Este término se emplea en los diagramas OPSpecs para indicar el nivel de confianza en la detección del tamaño de errores críticos. Ejemplo: 90% AQA(SE) significa que existe al menos un 90% de chances de detectar el error sistemático crítico cuando se trabaja dentro de los límites permitidos para imprecisión e inexactitud para una determinada regla control y un determinado número (N) de muestras control en una corrida analítica (R).

Aseguramiento de la calidad: Parte de la gestión de la calidad orientada a proporcionar confianza en que se cumplirán los requisitos o requerimientos de calidad (UNE-EN ISO 9000:2000).

Bias: La diferencia entre la media de mediciones replicadas y el valor aceptado como referencia. NOTA: En general, la desviación/diferencia es basada en mediciones replicadas usando un método aceptado (método de referencia o definitivo) y el método a ser

validado/verificado, y expresado en las unidades de la medición o como un porcentaje.

Carta o Diagrama de Especificaciones Operativas (OPSpecs chart): Gráfico de la inexactitud (en el eje de “y”) y de la imprecisión (en el eje de las “x”) que son permitidos para los diferentes procedimientos de Control de Calidad. Esta carta es elaborada para un requerimiento de calidad definido y para un dado nivel de “Aseguramiento de la Calidad Analítica (AQA)”.

Condiciones de Precisión Intermedia: Donde los resultados de la medición son obtenidos con el mismo método, con los mismos protocolos o procedimientos de medición y bajo alguna condición operativa diferente; NOTA: a) Existen cuatro elementos para las condiciones operativas: tiempo, calibración, operador, y equipos (instrumentos); b) los cambios de elementos en las condiciones operativas deben ser indicadas; esto permite obtener estimaciones de precisión corrientemente denominadas como: inter-corrida (between-run); intra-diaria (within-day); inter-diaria (between-day); inter-equipos (inter-device); e intra-laboratorio (within-laboratory), entre otros.

Condiciones de Repetibilidad: Condiciones donde resultados de medición independientes son obtenidos con el mismo método con idénticos materiales en el mismo laboratorio con el mismo operador usando el mismo equipo (instrumento) dentro de un corto intervalo de tiempo (ISO 3534- 1); NOTA: anteriormente se denominaba como precisión intra corrida (*within-run precision*).

Condiciones de Reproducibilidad: Condiciones donde los resultados de un método son obtenidos con el mismo método siguiendo idénticos protocolos de procedimientos en diferentes laboratorios con diferentes operadores usando diferentes equipos (instrumento) (ISO5725-1).

Control de la calidad en laboratorios de análisis clínicos: Son procesos estadísticos aplicados por el personal del laboratorio para monitorear y evaluar la estabilidad analítica de un método de análisis clínicos, con el objeto de suministrar resultados confiables al personal médico y/o a los pacientes. El proceso requiere:

- Análisis regulares de muestras controles en una misma corrida analítica junto con las muestras de los pacientes.
- Comparación de los resultados de las muestras controles con límites de confiabilidad establecidos a partir de la performance analítica del método previamente validado/verificado.

Los controles de la calidad en los laboratorios de análisis clínicos son:

- **Control externo de la calidad:** Procedimiento que utiliza los resultados de varios Laboratorios que analizan muestras, con el propósito de controlar la calidad (IFCC).
- **Control interno de la calidad:** Procedimiento que utiliza los resultados de muestras controles analizados en un solo laboratorio con el propósito de controlar la calidad (IFCC).

Corrida Analítica (Run, R): Un intervalo dentro del cual la veracidad (trueness) y precisión de un sistema de medición se mantienen estables, pero no puede ser superior a 24 h o menor a la frecuencia recomendada por el fabricante.

Curva de Poder: Es una línea en un gráfico de función de poder que describe la performance de ciertas reglas control con un determinado N.

Diferencia Permitida/Error Permitido: Magnitud de desviación analítica, de cualquier origen, que puede ser tolerado en un sistema de medición y que siempre reúne los requerimientos médicos (de calidad) del método.

Error Sistemático Crítico (ΔSEc): Es el tamaño del error sistemático que debe ser detectado para mantener los requerimientos de calidad definidos. Se calcula mediante la siguiente fórmula:

$$\Delta SEc = [(TEa - \text{bias})/s] - 1,65 \text{ (cuando el bias } \neq 0)$$

Donde TEa es el error total aceptable, bias (inexactitud) y s (imprecisión) obtenidos de los ensayos de Evaluación de Métodos.

Especificaciones Operativas (OPSspecs): Descripción de la imprecisión y bias permitidos y el Control de Calidad que es necesario para asegurar, con un dado nivel de confianza, que los requerimientos de calidad definidos son alcanzados en la operación de rutina.

Gestión de la calidad total: Filosofía organizativa integral que conduce a la excelencia y que promueve la mejora continua en todas las áreas, involucrando a todo el personal y a todas las funciones del laboratorio, con el objetivo final de satisfacer la necesidad médica y al paciente.

Gráficos de funciones de poder (*power function graphs*): Expresión gráfica del funcionamiento de una regla de control, representado como la probabilidad de rechazo (en la ordenada) en función del error aleatorio o sistemático medido en términos de desviación estándar (en abscisas) para una determinada regla control y número (N) de muestras controles. Si no existe más error que el inherente al método, la probabilidad de falso rechazo será el punto de intersección de la curva con el eje de ordenadas. Cuando existe un cierto incremento de estos errores, la curva representa las probabilidades de detectarlo.

Imprecisión: Dispersión de resultados independientes de mediciones obtenidas bajo condiciones especificadas.

Incertidumbre de una medición: Parámetro asociado con una medición que caracteriza la dispersión de los valores que podrían ser razonablemente atribuidos al mesurando. (VIM: 1993).

Material de Referencia: Material, suficientemente homogéneo y estable con respecto a una o más propiedades especificadas, para el cual ha sido establecida su aptitud para un uso determinado en un proceso de medición. (ISO-REMCO 2005).

Material de Referencia Certificado (MRC): Material de referencia, caracterizado por un procedimiento metrológicamente válido para una o más propiedades especificadas, acompañado

por un certificado que provee el valor de la propiedad certificada, su incertidumbre asociada y una declaración de su trazabilidad metrológica. (ISO-REMCO 2005).

Mesurando: Cantidad particular sujeto a la medición (VIM93). NOTA: a) Este término y definición comprende toda la cantidad, mientras que el término comúnmente usado “analito” refiere una entidad tangible sujeto a medición.

Muestra (Sample): Una o más partes tomadas de un sistema, lo cual permite obtener información de este sistema. NOTA: por ejemplo, un volumen de suero tomado de un volumen mayor de suero.

Planificación de la calidad: Parte de la gestión de la calidad enfocada al establecimiento de los objetivos de la calidad, a la especificación de los procesos operativos necesarios y de los recursos relacionados para cumplir con los objetivos de la calidad. (UNE-EN ISO 9000:2000).

Precisión: Grado de coincidencia entre resultados de mediciones independientes obtenidos bajo condiciones estipuladas.

Precisión Intermedia: Precisión bajo condiciones de precisión intermedia.

Precisión Intra-laboratorio (within-laboratory precision): Es un valor cuantitativo que representa las diferencias entre mediciones repetidas en un período prolongado (pero conocido) de tiempo; en estas condiciones se contemplan fuentes importantes de error (excepto mantenimientos mayores, recalibraciones, o cambio del lote de reactivos).

Probabilidad, p: Chance de que un evento ocurra, usualmente se emplea como nomenclatura la fracción decimal entre 0 y 1, donde 0 significa que el evento nunca ocurrirá y 1 significa que el evento siempre ocurrirá. Ej.: $p=0,05$, significa que existe un 5% de chance que el evento ocurra. En el diseño control de calidad normalmente “p” se utiliza para describir la chance que una corrida analítica sea verdaderamente rechazada (P_{de}) o falsamente rechazada (P_{fr}).

Probabilidad de detección de error, P_{de} : Es la probabilidad que tiene una regla control de rechazar una corrida analítica cuando el método ha perdido su estabilidad analítica y cuando existe un error analítico adicional al inherente del método.

Probabilidad de falso rechazo, P_{fr} : Es la probabilidad que tiene una regla control de rechazar una corrida analítica cuando el método se ejecutó con estabilidad analítica y sin error analítico adicional al inherente del método.

Punto Operativo(PO): Punto graficado en un Diagrama OPSpecs que representa el bias del método en “y” y el coeficiente de variación del método en “x”. Un procedimiento de Control de Calidad puede construirse a partir de la observación de la ubicación del “PO” respecto a las líneas que representan los límites de imprecisión e inexactitud aceptables para un determinado método. Una regla control apropiada, es aquella en la cual los límites operativos se encuentran por “encima” y más próximo del PO del método.

Rango de Medición o Rango Reportable o Intervalo de Medición: Un grupo de valores de mensurandos por el cual el error de una medición es intentado que caiga dentro de límites especificados. NOTAS: El rango o intervalo de valores (en unidades apropiadas para el analito) sobre el cual el criterio de aceptabilidad para el método ha sido cumplido; esto es, donde los errores dados por la no-linealidad, imprecisión u otros orígenes están dentro los límites definidos.

Regla operativa (regla de control): criterio utilizado para juzgar si una corrida analítica está bajo control o fuera de control. Se define por el símbolo " A_L ", siendo "A" el número de muestras controles, y "L" identifica los límites del control, usualmente especificados por múltiplos de la desviación estándar. Por ejemplo 1_{3s} .

Repetibilidad (de resultados de mediciones): Nivel de coincidencia entre resultados de sucesivas mediciones del mismo material realizado bajo las mismas condiciones de medición (VIM93).

Reproducibilidad (de resultados de mediciones): Nivel de coincidencia entre resultados de mediciones del mismo mensurando realizado bajo condiciones cambiantes de medición (VIM93).

Resultado Analítico: Para nuestro propósito, el resultado final de una medición realizado con un método sobre una muestra.

Robustez: Capacidad de un método para mantenerse sin cambios ante pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, que provee una indicación de su confiabilidad durante el uso normal. (EURACHEM Guide-1998).

Veracidad (Trueness): El nivel de coincidencia entre el valor promedio obtenido después de una larga serie de resultados de un método y un valor aceptado como referencia. NOTA: la medición de veracidad es usualmente expresada en términos de Bias.

Referencias bibliográficas y enlaces de interés:

www.aacc.org (American Association for Clinical Chemistry)
www.acb.org.uk (Association for Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine)
www.westgard.com (Sitio oficial de Westgard JO, PhD. Westgard Quality Corporation).
www.clsi.org (Clinical laboratory standard institute)
www.cap.org (College American Pathologists)
www.fda.gov (Food and Drug Administration)
www.ifcc.org (International Federation of Clinical Chemistry)
www.oaa.org.ar (Organismo argentino de acreditación)
www.iso.org (International Organization for Standardization)

Textos disponibles en la Biblioteca:

- *Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics. Fourth Edition, by Burtis CA and Ashwood ER. (2012).
- *Planning and Validating QC Procedures. Workshop Manual. Westgard JO, PhD. Westgard Quality Corporation. (1996).
- *OPSpecs Manual. Expanded Edition. Operating Specifications for Precision, Accuracy and Quality Control. Westgard JO, PhD. Westgard Quality Corporation. (1996).
- *Gestión de calidad en el laboratorio clínico. Fernández Espina, Camilo; Mazziotta, Daniel. -- Confederación Latinoamericana de Bioquímica Clínica. Editorial Medica Panamericana. (2005)
- *Practical Statistics for the Analytical Scientist by Ellison SLR, Barwick VJ and Trevor JDF. Second Edition (2009)
- * Análisis Instrumental. VI Edición. D.A. Skoog y J.J. Leary. De. Mc Graw Hill (2008)
- *Sans-Sabrafen I. Hematología Clínica. VI Edition. Ed. Doyme (2006).
- * Beutler y col. Hematologia. Ed. Marban (2005)
- *Bain y col. Practical Haematology. XII Edition 2007

Textos disponibles en la Asignatura:

- *Biological Variation: from principles to Practice, by Callum G. Fraser (2001).
- *Performance-Driven Quality Control, by Zoe C. Brooks (2001).
- *Basic QC Practices. Third Edition, by Westgard JO, PhD (2010).
- *Introduction to Biostatistics. A guide to Design, Analysis, and Discovery. Forthofer RN and Lee ES. Ed. by Academic Press. (1995).
- *Development and Validation of Analytical Methods. Ed. by Riley CM and Rovanske TW, Elsevier Science Ltd (1996).

OBJETIVOS DE LA ACTIVIDAD PRÁCTICA

Aplicar un protocolo de evaluación de un método analítico en términos de precisión, linealidad y veracidad, basado en las guías de CLSI en sus versiones EP5-A2, EP6-A y EP9-A2. Emplear programas de computación para el procesamiento estadístico de los datos.

TRABAJO PRÁCTICO N° 1
DETERMINACIÓN DE LA IMPRECISIÓN DE UN MÉTODO
ANALÍTICO A TRAVÉS DE LA ESTIMACIÓN DE LA
DESVIACIÓN ESTÁNDAR

La guía EP5-A2 propone experimentos sencillos para evaluar la precisión de métodos cuantitativos en química clínica. Esta guía está dirigida tanto a fabricantes, que desean establecer los valores de precisión para los equipos de medición que desarrollan, como a los bioquímicos que necesitan establecer la magnitud de los parámetros analíticos en comparación a los que informa el fabricante.

Experimento para la evaluación de precisión.

El experimento propuesto permite evaluar precisión intermedia el cual se lleva a cabo durante al menos 20 días operativos. Para ello, se tienen en cuenta las siguientes etapas:

1) Período de familiarización del método:

El primer paso en la evaluación de la precisión de un método analítico, es el período de familiarización con el método. Este período se recomienda que tenga la duración suficiente para que el bioquímico se familiarice con la técnica y se detecten todos los posibles errores operativos que puedan actuar como una fuente de variabilidad de los resultados.

2) Estimación preliminar de la precisión:

Durante el período de familiarización, como una evaluación preliminar de la precisión, se deben realizar 20 mediciones sucesivas en alícuotas de la misma muestra. Es recomendable realizar este experimento sobre dos o más niveles del mesurando. A partir de los resultados obtenidos se calcula la desviación estándar y el coeficiente de variación porcentual del método para cada concentración del mesurando (ver eq. 1). Estos datos serán de utilidad para la identificación de valores anómalos (*outliers*) en los sucesivos experimentos de evaluación de precisión intermedia.

3) Evaluación de la precisión intermedia del método:

Según la CLSI el experimento de evaluación de la precisión intermedia se debe realizar en al menos dos niveles de concentración, uno bajo y uno alto, lo cual permitirá evaluar la constancia de la imprecisión a lo largo del rango de medición. Además, en la elección de los niveles del mesurando se deben tener en consideración los Puntos de Decisión Médica (PDM) que caen dentro del rango de medición. Para cada nivel seleccionado, se deben realizar dos corridas analíticas diarias medidas por duplicado. Este procedimiento se debe repetir durante al menos 20 días operativos. Dentro de esta etapa experimental se debe seguir el siguiente criterio de aceptabilidad de las mediciones efectuadas:

Detección de Outliers:

La CLSI recomienda utilizar un criterio para la detección de *outliers* durante la realización del experimento.

Si el valor absoluto de la diferencia entre los duplicados excede 5,5 veces la desviación estándar determinada en la etapa 2, el par de valores debe ser rechazado.

Si un *outlier* es encontrado, la causa del problema debe ser investigada y la corrida repetida.
 Nota: este estadístico debe ser usado sólo cuando la concentración empleada en la etapa 2 este próxima a la concentración del mesurando evaluada en la etapa 3.

El cálculo de la desviación estándar se lleva a cabo de acuerdo a lo indicado en la ecuaciones siguientes (eq. 2 a 7)

4) *Estadísticos utilizados para el cálculo de la imprecisión:*

a) Estimación preliminar de la precisión (Eq. 1)

$$s = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^n (x_i - \bar{x})^2}{n - 1}}$$

b) Estimación de repetibilidad S_r (Eq. 2)

Se deriva de la siguiente fórmula:

$$S_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I \sum_{j=1}^2 (X_{ij1} - X_{ij2})^2}{4I}}$$

Donde,

I = número total de días (generalmente 20).

j = número de corrida en el día (1 ó 2).

X_{ij1} = resultado para el duplicado 1, corrida j en el día i .

X_{ij2} = resultado para el duplicado 2, corrida j en el día i .

d) Estimación de la Precisión Intermedia

Para el cálculo de este parámetro se requiere estimar los siguientes componentes de precisión:

$$A = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\bar{X}_{i_{1*}} - \bar{X}_{i_{2*}})^2}{2I}} \quad (\text{Eq. 3})$$

Donde,

I = número total de días (con dos corridas).

$\bar{X}_{i_{1*}}$ = resultado promedio de la corrida 1, día i (promedio de los duplicados).

$\bar{X}_{i_{2*}}$ = resultado promedio de la corrida 2, día i (promedio de los duplicados).

$$B = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\bar{X}_{i.} - \bar{X}_{...})^2}{I - 1}} \quad (\text{Eq. 4})$$

Donde,

I = número de días.

$\bar{X}_{i.}$ = promedio de todos los resultados del día i .

$\bar{X}_{...}$ = promedio de todos los resultados.

$$S_{dd}^2 = B^2 - \frac{A^2}{2} \quad (\text{Eq. 5})$$

$$S_{rr}^2 = A^2 - \frac{S_r^2}{2} \quad (\text{Eq. 6})$$

Si da negativa se debe corregir a 0.

Finalmente, la desviación estándar que estima la precisión intermedia (S_T) será:

$$S_T = \sqrt{S_{dd}^2 + S_{rr}^2 + S_r^2} \quad (\text{Eq. 7})$$

La correcta vía para estimar la precisión intermedia de un método cuantitativo, es a través de esta fórmula, ya que no solo pondera la repetibilidad, sino también el resto de los componentes de la precisión (inter-diario e inter-corrida). El coeficiente de variación porcentual ($CV\%$) correspondiente a esta estimación de precisión intermedia se calcula dividiendo S_T por la concentración media del analito evaluado multiplicado por 100.

5) Comparación de la Repetibilidad y Precisión Intermedia con las especificaciones de calidad del fabricante:

La precisión estimada anteriormente debe ser contrastada con especificaciones de calidad previamente establecidas. Como fue mencionado, en la Evaluación de Métodos esta comparación es realizada con las especificaciones establecidas por el fabricante a través de la Validación de Métodos. El estadístico empleado para tal fin es la prueba del *Chi Cuadrado*. La CLSI especifica que tanto la Repetibilidad como la Precisión Intermedia deben ser evaluadas por separado.

a) Comparación de la Repetibilidad

La prueba *Chi Cuadrado* utiliza las varianzas de las estimaciones efectuadas por el laboratorio y el fabricante. El número de grados de libertad asociados a S_r^2 debe ser igual al número total de corridas.

$$\chi^2 = \frac{S_r^2 * R}{\sigma_r^2}$$

Donde

S_r^2 = varianza de la repetibilidad (S_r) estimada por el laboratorio.

σ_r^2 = varianza de la repetibilidad (σ_r) estimada por el fabricante.

R = número total de corridas (grados de libertad para S_r^2).

b) Comparación de la Precisión Intermedia

La comparación en este caso es igual que la efectuada en el punto anterior, solo que el cálculo del χ^2 se modifica.

$$\chi^2 = \frac{S_T^2 * T}{\sigma_T^2}$$

Donde

S_T^2 = varianza de la precisión intermedia (S_T) estimada por el laboratorio.

σ_T^2 = varianza de la precisión intermedia (σ_T) estimada por el fabricante.

T = grados de libertad para S_T , de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$T = \frac{I * (2ME + MR + MD)^2}{2ME^2 + MR^2 + \frac{I}{I-1} * MD^2}$$

Donde,

$$ME = S_r^2$$

$$MR = 2A^2$$

$$MD = 4B^2$$

c) Conclusiones de la comparación:

El valor obtenido de χ^2 debe ser comparado con el valor de χ^2 tabulado en tablas o crítico, considerando los σ_r^2 o T grados de libertad según corresponda, para un 95% ó 99 % de confianza. Si el valor calculado es menor que el valor crítico entonces se deduce que no existen diferencias significativas entre los valores de imprecisión establecidos por el fabricante y los estimados por el laboratorio. Por lo tanto, se considera que el método cumple con las especificaciones de calidad establecidas por el fabricante y puede ser incluido a la rutina.

EJERCICIOS PRÁCTICOS

1) Un laboratorio de análisis clínicos, se propone determinar la imprecisión de su metodología para medir colesterol sérico a un nivel de 240 mg/dL, mediante un experimento de validación de la precisión, siguiendo las normativas estipuladas en la guía EP5-A2 de la CLSI. Se obtuvieron los siguientes datos:

Experimento de evaluación de la precisión de un método analítico				
Corrida 1			Corrida 2	
Día	Replicado 1 (mg/dL)	Replicado 2 (mg/dL)	Replicado 1 (mg/dL)	Replicado 2 (mg/dL)
1	242	246	245	246
2	243	242	238	238
3	247	239	241	240
4	249	241	250	245
5	246	242	243	240
6	244	245	251	247
7	241	246	245	247
8	245	245	243	245
9	243	239	244	245
10	244	246	247	239
11	252	251	247	241
12	249	248	251	246
13	242	240	251	245
14	246	249	248	240
15	247	248	245	246
16	240	238	239	242
17	241	244	245	248
18	244	244	237	242
19	241	239	247	245
20	247	240	245	242

a) Evalúe la presencia de outliers teniendo en cuenta que el experimento preliminar de la precisión arrojó un valor de $s = 4.9$ mg/dL. (Correspondiente a una concentración media de 244 mg/dL.)

b) Estime repetibilidad S_r y precisión intermedia S_T para el método.

c) Teniendo en cuenta que el fabricante especifica que $\sigma_r = 2,5$ mg/dL y $\sigma_T = 3,4$ mg/dL para una concentración media de 242 mg/dL, determine si el laboratorio se encuentra dentro de las especificaciones de calidad para precisión previamente establecidas

REPETIBILIDAD	
Analito:	
$S_r =$	Concentración =
$S_r^2 =$	Grados de Libertad (R):
$\sigma_r =$	
$\sigma_r^2 =$	
(I) $\chi^2 = \frac{S_r^2 \cdot R}{\sigma_r^2}$	
(II) $\chi_c^2 =$	
<input type="checkbox"/> No cumple con las especificaciones operativas (I > II) <input type="checkbox"/> Cumple con las especificaciones operativas (I ≤ II)	

PRECISIÓN INTERMEDIA	
Analito:	
$S_T =$	Concentración =
$S_T^2 =$	Grados de Libertad (T):
$\sigma_T =$	
$\sigma_T^2 =$	
(I) $\chi^2 = \frac{S_T^2 \cdot T}{\sigma_T^2}$	
(II) $\chi_c^2 =$	
<input type="checkbox"/> No cumple con las especificaciones operativas <input type="checkbox"/> Cumple con las especificaciones operativas	

d) En base a los datos obtenidos del experimento de validación de la precisión, elaborar la carta control correspondiente (tipo Levey - Jennings) y utilizando los siguientes valores de concentración de una muestra control, concluir a cerca de la validez de cada corrida.

DÍA	CORRIDA 1 (mg/dL)	CORRIDA 2 (mg/dL)
21	242	252
22	245	247
23	251	263
24	230	241
25	258	228

TRABAJO PRÁCTICO N° 2
EVALUACION DE LA LINEALIDAD DE UN MÉTODO
ANALÍTICO

Los conceptos definidos por la CLSI en la guía EP-6A establecen pautas de evaluación del intervalo lineal de métodos analíticos en química clínica. Estas pautas se basan en establecer estadísticamente la existencia de comportamiento lineal de los datos a través de análisis de regresión polinomial. Así mismo, la CLSI especifica que es importante que cada bioquímico defina sus propios requerimientos de linealidad en casos de comportamiento de no linealidad. Los resultados obtenidos deben ser comparados con los requerimientos de calidad y determinar el grado de cumplimiento.

El experimento para evaluar la linealidad propuesto por la CLSI se basa en el método polinomial propuesto por Kroll y colaboradores (*Arch Pathol Lab Med* 2000; 124: 1331-38). Este método es estadísticamente riguroso y puede ser fácilmente implementado a partir del uso de programas de computación.

Experimento para la evaluación de la linealidad del método:

La evaluación polinomial primero asume que el conjunto de datos es no lineal. Esta estimación es paramétrica y establece que los datos pueden seguir el comportamiento definido por una ecuación matemática de al menos tres órdenes de regresión:

- i) Primer orden: $y = b_0 + b_1x$. Tipo de curva: Lineal.
- ii) Segundo orden: $y = b_0 + b_1x + b_2x^2$. Tipo de curva: No lineal de saturación superior (*curve-up*) o inferior (*curve-down*).
- iii) Tercer orden: $y = b_0 + b_1x + b_2x^2 + b_3x^3$. Tipo de curva: No lineal tipo Sigmoidea o Forma-S (*s-shaped*).

A su vez se asume que el error aleatorio está homogéneamente distribuido en todo el intervalo. Si la curva resultante del análisis de regresión polinomial es lineal o no lineal, esto no afecta la capacidad del sistema analítico para interpolar datos experimentales.

Para evaluar la linealidad de un método por análisis de regresión polinomial se requieren al menos cinco niveles diferentes de concentración del mesurando que permitan cubrir todo el rango de medición. La CLSI recomienda que la distribución de los datos sea equidistante, los cuales pueden ser obtenidos por dilución o formulación.

La evaluación de la linealidad se basa en dos etapas. La primera examina si un polinomio no lineal ajusta mejor que los datos de un polinomio lineal. Mientras que la segunda etapa surge a partir de que dos o más polinomios representan el comportamiento de los datos de manera significativa, siendo en este caso necesario seleccionar aquel polinomio que de la interpolación de datos resulte el menor Bias.

La CLSI aconseja realizar los experimentos de linealidad en el menor tiempo posible, preferentemente en una misma corrida analítica.

1) Niveles de concentraciones del mesurando utilizar en la evaluación de linealidad.

- a) Laboratorios que desarrollen nuevos métodos y definan rangos de medición, deben utilizar entre 9 y 11 niveles de concentración. Es aconsejable, en este caso, que se amplíe hasta un 20 o 30% los niveles de concentración por fuera de los límites del rango de medición. Las mediciones

deben ser realizadas en 2 a 4 replicados por nivel. Este sería el caso de Validación de la Linealidad que debe ser efectuado por el fabricante.

b) Laboratorios que necesitan validar métodos propios o que han sido modificados en sus procedimientos de ejecución, deben utilizar 7 a 9 niveles de concentración medidos en 2 ó 3 replicados por nivel.

c) Laboratorios que necesitan demostrar que un método analítico está dentro de las especificaciones de calidad establecidas por el fabricante deben evaluar la linealidad empleando 5 a 7 niveles de concentración medidos por duplicado.

A continuación se abordarán aspectos experimentales referidos con el ítem c), siendo este planteamiento aplicable a los otros ítems.

Cinco niveles de concentración representan la cantidad mínima de datos para aplicar el análisis de regresión polinomial con un adecuado grado de confianza. La CLSI recomienda obtener los cinco niveles de concentración a través de la mezcla de diferentes proporciones de dos muestras con alto y bajo nivel de mesurando, de acuerdo al siguiente esquema:

Nivel 1: Bajo (B)
Nivel 2: 0,75B + 0,25A
Nivel 3: 0,50B + 0,50A
Nivel 4: 0,25B + 0,75A
Nivel 5: Alto (A)

Para calcular la concentración teórica de los diferentes niveles se recomienda aplicar la siguiente ecuación:

$$\text{Concentración} = \frac{C_1 * V_1 + C_5 * V_5}{V_1 + V_5}$$

Donde C_1 y C_5 son las concentraciones bajas y altas del Nivel 1 y 5, respectivamente; mientras que V_1 y V_5 son los volúmenes empleados para realizar las distintas proporciones.

2) *Período de Familiarización:*

Si los experimentos de precisión fueron realizados con anterioridad, este período no será necesario de ser nuevamente llevado a cabo. En caso contrario, se procede de la misma manera que para la evaluación de la precisión.

3) *Recolección de los datos:*

Se analizará por regresión polinomial los resultados obtenidos de la medición por duplicado de los 5 niveles de concentración.

La evaluación del rango lineal debe incluir:

- a) Concentración analítica mínima o límite inferior del rango lineal
- b) Los Puntos de Decisión Médica (PDM)

c) Concentración analítica máxima o límite superior del rango lineal

4) *Análisis estadístico de los datos:*

a) Evaluación preliminar visual de los datos

Evaluación visual de la distribución de los datos tabulados con el objeto de identificar desviaciones aberrantes (potenciales *outliers*).

Si estas desviaciones no son evidentes, se deben efectuar los siguientes procedimientos gráficos:

i) Gráfico de los duplicados de los diferentes Niveles (eje *Y*) versus Concentración calculada o teórica (eje *X*).

ii) Gráfico de la media de los duplicados de los diferentes niveles (eje *Y*) versus Concentración calculada o teórica (eje *X*). En este caso, si se grafican las medias de los duplicados, conectar los puntos manualmente o mediante programas de computación. Esto facilita la identificación de desviaciones groseras de la linealidad así como también la detección de *outliers*.

Solo la inspección visual de los gráficos realizados en el punto anterior permite detectar desviaciones evidentes, los cuales deberán ser descartados y nuevamente medidos. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de emplear análisis estadísticos que permitan detectar de manera más objetiva la presencia de *outliers*, como el Test de Dixon entre otros.

b) Regresión Polinomial

Los coeficientes de regresión son indicados como b_i . En el modelo de segundo orden, b_2 es el coeficiente no lineal; mientras que en el modelo de tercer orden, tanto b_2 como b_3 son los coeficientes de no linealidad. Luego, es necesario obtener los errores estándar de las pendientes de los coeficientes de no linealidad, EE_i . Con esta información se procede a aplicar un *test* τ para determinar si los coeficientes son significativamente diferentes de cero. Finalmente, b_0 y b_1 no son evaluados por tratarse de coeficientes de linealidad. El *test* τ aplicado para b_2 y b_3 es el siguiente:

$$\tau = \frac{b_i}{EE_i}$$

Para poder comparar el τ calculado con un τ crítico, es necesario disponer de los grados de libertad (gl) obtenidos a partir de la siguiente ecuación:

$$gl = L * R - Rgl$$

Donde, L es el número de niveles medidos, R es el número de replicados en cada nivel y Rgl es el número de coeficientes presentes en la ecuación polinomial. En nuestro caso, L es igual a 5, R es igual a 2 y Rgl podrá adoptar valores de 2, 3 ó 4 dependiendo de que la ecuación sea de primer, segundo o tercer orden polinomial, respectivamente.

Si los coeficientes no lineales, b_2 y b_3 (ambos), son no significativos ($p > 0,05$), se considera que el conjunto de datos es lineal.

Si cualquiera de los coeficientes no lineales, b_2 en el modelo de segundo orden o b_3 y/o b_2 en el modelo de tercer orden son significativos ($p < 0,05$), se considera el conjunto de datos como no lineales.

Finalmente, dada la situación en que dos o más ecuaciones polinomiales ajusten al conjunto de datos, se deduce que el mejor modelo polinomial de ajuste será el que tenga el menor valor de desviación estándar de la regresión ($S_{y \cdot x}$). Este estadístico estima el grado de variabilidad de las diferencias entre los datos medidos y los obtenidos por predicción del modelo. Es por eso que la ecuación polinomial con la menor $S_{y \cdot x}$ provee el mejor ajuste de los datos.

c) Desviación de la linealidad a cada nivel

La desviación de la linealidad (DL_i) a cada concentración puede ser calculada a partir de la siguiente ecuación:

$$DL_i = p(x_i) - (b_0 + b_1 * x_i)$$

Donde los valores de x_i van de x_1 a x_n y $p(x_i)$ es el valor del mejor polinomio no lineal de ajuste de los datos en el punto x_i .

DL_i es la diferencia entre el modelo de segundo orden y el modelo de primer orden (lineal) a cada nivel de concentración, o la diferencia entre el modelo de tercer orden y el modelo lineal. Esta es una medida de la diferencia entre el modelo no lineal y el lineal a cada concentración. El DL_i se puede expresar en las unidades de concentración del mesurando o en porcentual. Este valor necesita ser comparado con valores de DL_i definidos como especificaciones de calidad, los cuales también pueden ser expresados en concentración o porcentual definidos dentro del rango de medición evaluado. Esta situación puede ser evaluada gráficamente representando en el eje Y los valores DL_i y en el eje X los niveles de concentración evaluados (Gráfica de Diferencias o *difference plot*).

Otro aspecto a tener en cuenta en este análisis es que los DL_i son calculados solo con los valores definidos para cada nivel de concentración, dado que los valores entre los niveles pueden no ajustar con algunos de los polinomios evaluados.

Si cada uno de los DL_i es menor a las especificaciones de calidad establecidas, no importa que la no linealidad sea estadísticamente significativa, ya que la cantidad de error no lineal está dentro de dichas especificaciones. Si alguno de los DL_i excede la especificación de calidad, posiblemente exista un problema de no linealidad a ese nivel. En este caso se aconseja aplicar alguna de las dos posibles soluciones:

i) Encontrar la razón de no linealidad y corregirla. Entre las razones podemos mencionar la preparación de la muestra; interferencias; calibración de los instrumentos; entre otras. Una vez corregida se realiza nuevamente la evaluación de la linealidad.

ii) Examinar de manera visual el gráfico de diferencias y determinar si la no linealidad está en algún extremo o en el medio del rango de medición. En el caso de que la desviación sea evidente en algunos de los extremos, se procederá a eliminar este punto y procesar nuevamente los datos. Esto determinará la reducción del rango de medición. En cambio, si la no linealidad está en el medio del rango de medición, se puede concluir que el modelo es no lineal de no existir algunas de las razones indicadas en el ítem anterior.

EJERCICIOS PRÁCTICOS

1) Un laboratorio de análisis clínicos, que corroboró que su imprecisión se encuentra dentro de las especificaciones de calidad establecidas por el fabricante para la determinación de colesterol sérico, se propone evaluar la linealidad de su metodología siguiendo las normativas propuestas por la CLSI en su guía EP6-A.

a) Completar lasiguiente tabla calculando las “**concentraciones teóricas**” delos niveles 2, 3 y 4 apartir de los niveles 1 (Bajo) y 5 (Alto) y las medias de los replicados correspondientes para cada nivel medido.

Nivel	Concentración Teórica (mg/dL)	Replicado 1 (mg/dL)	Replicado 2 (mg/dL)	Media de Replicados (mg/dL)
1	30	29	31	
2		140	152	
3		259	265	
4		377	385	
5	500	490	507	

b) Evaluar la existencia de outliers por medio de la inspección visual de los datos.

c) Realizar el análisis de regresión polinomial correspondiente y definir el polinomio que mejor ajusta los datos.

Orden	Coeficiente	Valor del Coeficiente	Error estándar del Coeficiente	t	p -Valor	Grados de Libertad	Desviación Estándar Residual
Primer	b_0						
Primer	b_1						
Segundo	b_0						
Segundo	b_1						
Segundo	b_2						
Tercer	b_0						
Tercer	b_1						
Tercer	b_2						
Tercer	b_3						

2) Un laboratorio de análisis clínicos, que corroboró que su imprecisión se encuentra dentro de las especificaciones de calidad establecidas por el fabricante para la determinación de IgM sérica por ELISA, se propone evaluar la linealidad de su metodología siguiendo las normativas propuestas por la CLSI en su guía EP6-A.

a) Completar la siguiente tabla calculando las “**concentraciones teóricas**” de los niveles 2, 3 y 4 a partir de los niveles 1 (Bajo) y 5 (Alto) y las medias de los replicados correspondientes para cada nivel medido.

Nivel	Concentración Teórica (mg/dL)	Replicado 1 (mg/dL)	Replicado 2 (mg/dL)	Media de Replicados (mg/dL)
1	25	26,5	26,2	
2		139	138	
3		269	273	
4		337	343	
5	410	409	404	

b) Evaluar la existencia de outliers por medio de la inspección visual de los datos.

c) Realizar el análisis de regresión polinomial correspondiente y definir el polinomio que mejor ajusta los datos.

Orden	Coeficiente	Valor del Coeficiente	Error estándar del Coeficiente	t	p -Valor	Grados de Libertad	Desviación Estándar Residual
Primer	b_0						
Primer	b_1						
Segundo	b_0						
Segundo	b_1						
Segundo	b_2						
Tercer	b_0						
Tercer	b_1						
Tercer	b_2						
Tercer	b_3						

d) Confeccionar las Gráficas de Diferencias en caso que el polinomio que mejor ajusta los datos sea no lineal.

Actual	Predicho	Predicho	Diferencia	% Diferencia
<i>Media</i>	<i>L</i>	<i>C</i>	<i>C - L</i>	$\frac{(C - L)}{Media} * 100$

e) Concluir sobre la validación de la linealidad para el laboratorio teniendo en cuenta que el criterio de no linealidad permitida es del 5 %.

TRABAJO PRÁCTICO N° 3
EVALUACIÓN DE LA VERACIDAD (TRUENESS) DE UN
MÉTODO ANALÍTICO (COMPARACIÓN DE MÉTODOS Y
ESTIMACIÓN DEL *BIAS*).

Los experimentos de comparación de métodos permiten calcular el valor de *bias* de un método en evaluación respecto a otro método considerado de referencia. La CLSI recomienda el procesamiento de al menos 40 muestras de pacientes, analizadas por duplicado, utilizando ambas técnicas, durante por lo menos 5 días operativos. Es importante tener en cuenta que durante la realización del experimento los métodos deben estar correctamente controlados (en términos de precisión y linealidad). Los operadores deben estar familiarizados con la operatividad de los métodos, el mantenimiento de los procedimientos, la preparación de las muestras y la calibración y monitoreo de las funciones.

Experimento para la evaluación de la veracidad del método:

Con respecto a las condiciones que debe cumplir el método utilizado como referencia la CLSI recomienda:

- i) Que sea más preciso que el método a evaluar.
- ii) Que esté libre de interferentes conocidos, siempre que sea posible.
- iii) Que use las mismas unidades que el método a evaluar.
- iv) Que tenga un *bias* relativo establecido (*traceability*) en relación a Materiales de Referencia Certificados (MRC) o a métodos definitivos, siempre que esto sea posible.

Es importante que las concentraciones del mesurando cubran todo el rango de medición e incluyan los Puntos de Decisión Médica (PDM).

Con respecto a la secuencia con que se analizan las muestras de pacientes, la CLSI recomienda que los duplicados se procesen siguiendo un ordenamiento inverso para disminuir los efectos de arrastre o *carryover*.

- 1) *Análisis Estadístico de los datos*
- a) Procedimientos estadísticos para la detección de *Outliers*

Antes de realizar el análisis exhaustivo de los datos obtenidos, se deben emplear estadísticos para la detección de *outliers* dentro de cada método y entre los métodos. Para ello se aconseja aplicar los siguientes criterios estadísticos:

- i) Estadísticos para detección de *outliers* dentro de los métodos:

Primero se calcula el valor absoluto de la diferencia de los duplicados para cada uno de los métodos DX_i y DY_i , siendo el método de referencia X y el método a evaluar Y :

$$DX_i = |x_{i1} - x_{i2}|$$

$$DY_i = |y_{i1} - y_{i2}|$$

Donde i es el número de muestra que va desde 1 a N , siendo N el número total de muestras de pacientes.

Calcular luego la media de los valores absolutos de la diferencia de los duplicados para cada método (\overline{DX} y \overline{DY}):

$$\overline{DX} = \frac{\sum DX_i}{N}$$

$$\overline{DY} = \frac{\sum DY_i}{N}$$

Determinar los límites de aceptación para los métodos X e Y como cuatro veces \overline{DX} y \overline{DY} respectivamente (por convención se debe redondear el valor obtenido al número próximo en función de la cantidad de cifras significativas con que se informan los resultados, por ejemplo: 15,1 será 16; 19,9 será 20, etc., si los resultados son informados sin decimales). Si cualquier valor DX o DY excede su correspondiente valor límite, hacer un cálculo adicional para cada método usando el valor absoluto de la diferencia normalizada de los duplicados DX'_i y DY'_i y la media de los valores absolutos de las diferencias normalizadas $\overline{DX'}_i$ y $\overline{DY'}_i$ de los duplicados

$$DX'_i = \frac{|x_{i1} - x_{i2}|}{\bar{x}_i}$$

$$DY'_i = \frac{|y_{i1} - y_{i2}|}{\bar{y}_i}$$

$$\overline{DX'}_i = \frac{\sum DX'_i}{N}$$

$$\overline{DY'}_i = \frac{\sum DY'_i}{N}$$

Para valores normalizados los límites de aceptación para los métodos X e Y son cuatro veces los valores de $\overline{DX'}_i$ y $\overline{DY'}_i$, respectivamente. Luego se compara cada valor DX'_i y DY'_i con su correspondiente valor límite normalizado.

Si un único dato cae fuera de los límites obtenidos con la diferencia y la diferencia relativa de duplicados se debe investigar las causas y eliminar la muestra del conjunto de datos. Continuar analizando los datos después de eliminar los valores X e Y de esa muestra. Si más de una muestra tiene que ser eliminada, se debe realizar una exhaustiva investigación de las causas de esta discrepancia.

ii) Estadísticos para la detección de *outliers* entre los métodos:

Calcular el valor absoluto de la diferencia entre cada uno de los valores obtenidos por el método en estudio y el promedio de los obtenidos por el método de referencia (E), a partir de la siguiente ecuación:

$$E_{ij} = |y_{ij} - \bar{x}_i|$$

Donde i =número de muestra y j =número de duplicado (1 ó 2).

La media de los E (\bar{E}) se calcula por la siguiente ecuación:

$$\bar{E} = \frac{1}{2N} * \sum_i^N \sum_j^2 E_{ij}$$

Calcular el valor límite como cuatro veces \bar{E} (por convención se debe redondear el valor obtenido al número próximo en función de la cantidad de cifras significativas con que se informan los resultados, por ejemplo: 15,1 será 16; 19,9 será 20, etc., si los resultados son informados sin decimales). Comparar cada E con el valor límite y especificar cualquier punto que se exceda del límite.

Luego definir los E normalizados (E') mediante la siguiente ecuación:

$$E'_{ij} = \frac{|y_{ij} - \bar{x}_i|}{\bar{x}_i}$$

Y por último calcular la media de los E normalizados, (\bar{E}'), según la siguiente ecuación:

$$\bar{E}' = \frac{1}{2N} * \sum_i^N \sum_j^2 E'_{ij}$$

El valor límite es definido como cuatro veces \bar{E}' (aquí no se aplica el criterio de redondeo). Los valores de E'_{ij} se comparan con este valor límite.

En conclusión, si un punto (X_{ij}, Y_{ij}) supera los límites establecidos con ambos procedimientos estadísticos es considerado un *outlier*. Si más del 2,5 % de los datos representan *outliers* investigar posibles interferencias, errores humanos y mal funcionamiento de equipos.

Finalmente, es importante considerar que si un *outlier* es detectado, pero esta desviación constituye un valor que no tiene relevancia clínica, se recomienda retener la muestra e incluir los valores medidos al procesamiento de los datos.

b) Gráficos:

La representación gráfica de los datos permite realizar una inspección visual de los mismos con la finalidad de detectar corrimientos sistemáticos y valores aberrantes u *outliers*. Para el análisis y la representación visual de los datos se debe:

i) Graficar la media de los duplicados obtenidos por el método en estudio (\bar{Y}_i) versus la media de los duplicados obtenidos por el método comparativo (\bar{X}_i). Los orígenes y las escalas en ambos ejes deben ser idénticos y se debe trazar una recta con pendiente 1 desde el origen, la cual servirá como línea de identidad. El caso ideal estaría representado por esta recta ya que define que ambos métodos miden igual (veracidad ideal).

ii) Graficar cada uno de los datos obtenidos por el método en estudio (Y_{ij}) versus las correspondientes medias de los duplicados obtenidos por el método comparativo (\bar{X}_i). Este gráfico se debe completar con las mismas consideraciones mencionadas en el punto anterior.

iii) Graficar la diferencia $\bar{Y}_i - \bar{X}_i$ versus \bar{X}_i y en otro gráfico la diferencia $Y_{ij} - \bar{X}_i$ versus \bar{X}_i (Bland Altman plots).

c) Evaluación del rango de medición en X:

La aplicación del análisis de regresión lineal en la comparación de métodos debe ser realizada con algunas salvedades. Una de ellas es que la variable X es de valor conocido y sin error asociado. Esta salvedad en química clínica es impracticable dado que todos los métodos analíticos tienen un error intrínseco asociado. Sin embargo, esto puede ser subsanado si el rango de medición es lo suficientemente amplio, lo cual permite hacer no significativo el error sobre la estimación de la regresión. De este modo el estadístico coeficiente de correlación r puede ser utilizado para aproximar la efectividad del rango de medición en X en la compensación de dicho error:

$$r = \frac{\sum_i^N (\bar{x}_i - \bar{x})(\bar{y}_i - \bar{y})}{\sqrt{\sum_i^N (\bar{x}_i - \bar{x})^2} * \sqrt{\sum_i^N (\bar{y}_i - \bar{y})^2}}$$

Donde,

$$\bar{x} = \frac{\sum \sum x_{ij}}{2N}$$

$$\bar{y} = \frac{\sum \sum y_{ij}}{2N}$$

Como guía general, el rango de medición de X puede ser considerado adecuado si $r > 0,975$ lo que equivale decir que $r^2 \geq 0,95$. Si el r satisface estas condiciones, se dice que el error en X es adecuadamente compensado por el rango de medición y un análisis de regresión lineal simple puede ser utilizado para estimar la pendiente y la ordenada al origen.

Si el $r^2 < 0,95$, el rango de medición debe ser extendido ensayando muestras adicionales y repetir el cálculo de los estadísticos. Si el rango no puede ser extendido, para estimar el *bias* promedio se deberá utilizar el procedimiento de estimación particionado (no explicado en esta guía) en lugar de la regresión lineal simple.

d) Regresión Lineal

Para los pares de observaciones (x_{ij}, y_{ij}) la pendiente (b) y la ordenada al origen (a) son calculados de acuerdo a las siguientes ecuaciones:

$$b = \frac{\sum_i^N \sum_j^2 (x_{ij} - \bar{x})(y_{ij} - \bar{y})}{\sum_i^N \sum_j^2 (x_{ij} - \bar{x})^2}$$

Donde,

$$\bar{y} = \frac{\sum \sum y_{ij}}{2N}$$

$$\bar{x} = \frac{\sum \sum x_{ij}}{2N}$$

La ecuación de la recta es:

$$\hat{Y} = bX + a$$

Para cualquier concentración (X), esta ecuación puede ser utilizada para obtener un valor predictivo (\hat{Y}) del método analítico.

Existen otros procedimientos estadísticos de análisis de regresión lineal, tales como Regresión de Deming o Regresión de Passing-Bablok, que también pueden predecir la pendiente y la ordenada al origen a partir de sus respectivas ecuaciones. Sin embargo, estos estadísticos obtienen una desviación estándar de la regresión ($S_{y \cdot x}$) artificialmente baja respecto a la obtenida con la regresión simple. Por lo tanto, el cálculo de $S_{y \cdot x}$ por estos análisis de regresión debe ser efectuado en función de las distancias verticales y no de las ortogonales.

e) Cálculo del *Bias* y su intervalo de confianza

La diferencia, medida en la dirección de Y , entre un dado punto y la línea de regresión, es conocida como el residual de ese punto. La desviación estándar de los residuales es la ya mencionada desviación estándar de la regresión ($S_{y \cdot x}$), la cual constituye una medida de la dispersión de los datos alrededor de la línea de regresión. El residual para un punto (y_{ij}) puede ser calculado usando la siguiente ecuación:

$$Residual_{ij} = y_{ij} - \hat{Y}_{ij} = y_{ij} - (a + b\bar{x}_{ij})$$

Para el cálculo del error estándar de la regresión se deben resolver las siguientes ecuaciones para los y_{ij} :

$$S_{y \cdot x} = \sqrt{\frac{\sum \sum (y_{ij} - \hat{Y}_{ij})^2}{2N - 2}}$$

Donde, $\sum \sum (y_{ij} - \hat{Y}_{ij})^2$ es la sumatoria de los cuadrados de los residuales.

La estimación para el *Bias* (B_c) a un dado Nivel de Decisión Médica (X_c) está dado por:

$$\hat{B}_c = a + (b - 1)X_c$$

El intervalo para el B_c (el verdadero B_c para X_c) para un 95% de confianza está dado por:

$$[B_{c,bajo}, B_{c,alto}] = \hat{B}_c \pm 2S_{y \cdot x} \sqrt{\frac{1}{2N} + \frac{(X_c - \bar{x})^2}{\sum \sum (x_{ij} - \bar{x})^2}}$$

f) Comparación del *Bias* estimado y su intervalo de confianza con el *Bias* aceptable.

Consideraciones:

- El bias aceptable se obtendrá de los requerimientos de calidad:

CLIA: Como CLIA informa solo valores de ET aceptable se podrá utilizar presupuesto de error para obtener el bias permitido.

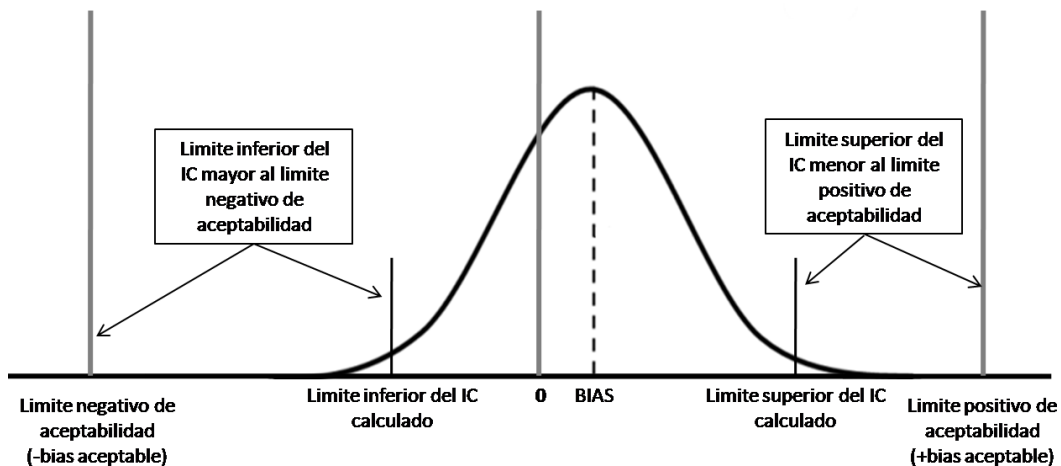
EQA: Setoman los valores de *inaccuracy* aceptables.

VB: Se calcula el bias aceptable al nivel deseado.

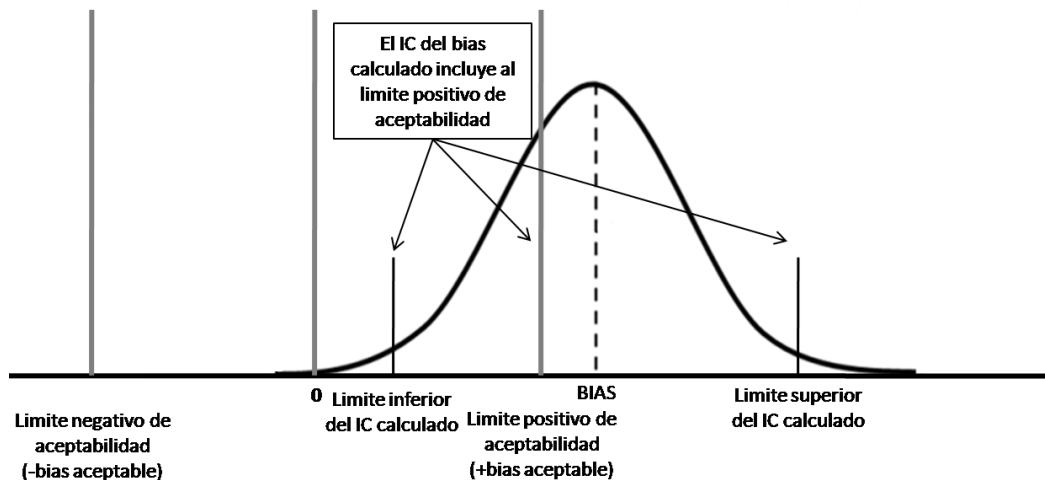
- Para el requerimiento de bias seleccionado se deberán calcular los valores absolutos (en unidades) para el nivel de decisión médica evaluado.
- Los requerimientos de bias se informan como corrimientos máximos que pueden ser positivos o negativos (\pm bias aceptable) y corresponden a los límites positivos o negativos de aceptabilidad.

Al comparar el bias estimado y su intervalo de confianza (IC) con el bias aceptable puede suceder:

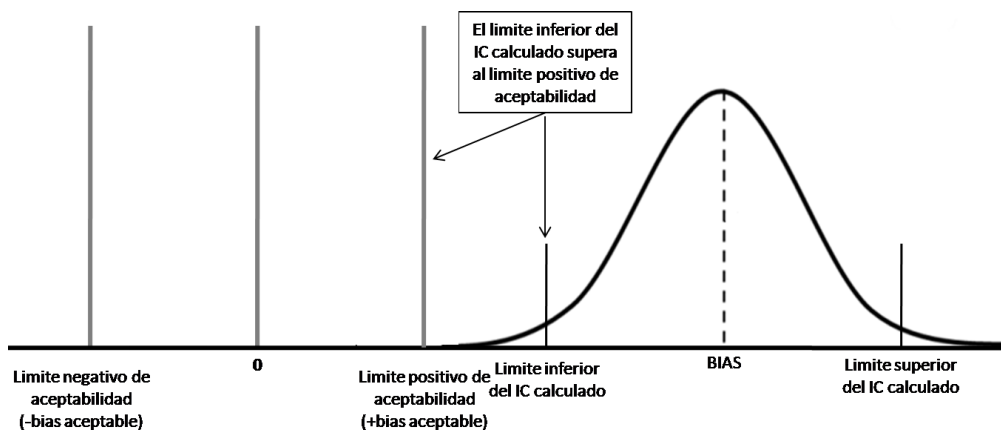
- 1) Que el intervalo de confianza quede comprendido entre el límite positivo y el negativo de bias aceptable: límite superior del IC menor al límite positivo de aceptabilidad y límite inferior del IC mayor al límite negativo de aceptabilidad. En este caso se dice que el método en estudio cumple con las especificaciones de calidad previamente establecidas, ya que posee un error menor al permitido, con una probabilidad $> 97,5 \%$.



- 2) Que el intervalo de confianza incluya al límite positivo o al negativo de bias aceptable o incluya a ambos. En este caso se concluye que entre el *Bias* aceptable y el del método en estudio no existen diferencias estadísticamente significativas. El método en estudio cumple con las especificaciones de calidad previamente establecidas.



- 3) Que el intervalo de confianza quede fuera de los límites de aceptabilidad: límite inferior del IC mayor al límite positivo de aceptabilidad (para bias positivos) o límite superior del IC menor al límite negativo de aceptabilidad (para bias negativos). En este caso se dice que el método en estudio no cumple con las especificaciones de calidad previamente establecidas, ya que posee un error mayor al permitido, con una probabilidad $> 97,5 \%$.



EJERCICIOS PRÁCTICOS

1) Un laboratorio de análisis clínicos, que en pasos previos validó la precisión y la linealidad en su metodología para determinar colesterol sérico, desea estimar el *bias* de dicho método. Para ello lleva a cabo un experimento de comparación de métodos siguiendo las normativas estipuladas en la guía EP9-A2 de la CLSI. Se obtuvieron los siguientes datos:

Experimento de evaluación de la veracidad de un método analítico				
Día	Método de Referencia (X)		Método en Estudio (Y)	
	Replicado 1 (mg/dL)	Replicado 2 (mg/dL)	Replicado 1 (mg/dL)	Replicado 2 (mg/dL)
1	86	80	87	82
2	155	158	165	158
3	202	194	197	208
4	47	50	43	45
5	72	72	68	70
6	176	177	184	180
7	218	222	227	220
8	136	138	140	140
9	175	170	168	173
10	79	78	87	86
11	147	150	144	152
12	250	245	264	248
13	45	44	45	49
14	98	96	92	87
15	69	73	74	73
16	53	57	63	60
17	149	155	147	154
18	200	211	204	209
19	110	108	106	97
20	123	120	125	120
21	136	132	132	124
22	98	102	101	104
23	199	206	211	204
24	72	70	67	68
25	192	193	184	176
26	95	98	97	92
27	132	130	143	145
28	113	122	106	117
29	86	90	84	80
30	207	205	201	199
31	147	141	154	153
32	75	70	76	79
33	62	59	55	53
34	179	184	181	174
35	261	254	243	256
36	128	126	127	124
37	85	82	84	87
38	68	66	62	62
39	138	143	137	135
40	106	107	104	111

- a) Evalúe la presencia de outliers “**dentro de cada método**” y “**entre los métodos**”.
- b) Graficar \bar{Y}_i versus \bar{X}_i e Y_{ij} versus \bar{X}_i . Analice como mide el método en estudio comparando con la línea identidad.
- c) Calcule el coeficiente de correlación de *Pearson* y determine si el análisis de regresión lineal simple puede ser empleado para estimar la pendiente y la ordenada al origen de la recta.
- d) Complete la siguiente tabla:

Coeficiente	Valor del Coeficiente	Error estándar del Coeficiente	LI (95%)	LS (95%)	t	p -Valor	$S_{(Y \cdot X)}$
a							
b							

Según estos resultados ¿Es la ordenada al origen estadísticamente diferente de 0? ¿Y es la pendiente estadísticamente diferente de 0?

- e) Estime el *bias* para un nivel de 240 mg/dL. Defina el correspondiente intervalo del 95% confianza.

Distribución de Student (t)
Área bajo la curva en las dos colas

g. l.	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
120	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617

Tabla de valores *Chi-Cuadrado*

g. l.	Valor Crítico 95%	Valor Crítico 99%
5	11.1	15.1
6	12.6	16.8
7	14.1	18.5
8	15.5	20.1
9	16.9	21.7
10	18.3	23.2
11	19.7	24.7
12	21.0	26.2
13	22.4	27.7
14	23.7	29.1
15	25.0	30.6
16	26.3	32.0
17	27.6	33.4
18	28.9	34.8
19	30.1	36.2
20	31.4	37.6
25	37.7	44.3
30	43.8	50.9
35	49.8	57.3
40	55.8	63.7
50	67.5	76.2
60	79.0	88.4
70	90.5	100.4
75	96.2	106.4
79	100.7	111.1
80	101.9	112.3
90	113.1	124.1
100	124.3	135.6

Routine Chemistry		Hematology	
Test or Analyte	Acceptable Performance	Test or Analyte	Acceptable Performance
Alanine aminotransferase	Target value \pm 20%	Cell identification	90% or greater consensus on identification
Albumin	Target value \pm 10%	White cell differentiation	Target \pm 3 SD based on percentage of different types of white cells
Alkaline phosphatase	Target value \pm 30%	Erythrocyte count	Target \pm 6%
Amylase	Target value \pm 30%	Hematocrit	Target \pm 6%
Aspartate aminotransferase (AST)	Target value \pm 20%	Hemoglobin	Target \pm 7%
Bilirubin, total	Target value \pm 0.4 mg/dL or \pm 20% (greater)	Leukocyte count	Target \pm 15%
Blood gas pO ₂	Target value \pm 3 SD	Platelet count	Target \pm 25%
Blood gas pCO ₂	Target value \pm 5 mm Hg or \pm 8% (greater)	Fibrinogen	Target \pm 20%
Blood gas pH	Target value \pm 0.04	Partial thromboplastin time	Target \pm 15%
Calcium, total	Target value \pm 1.0 mg/dL	Prothrombin time	Target \pm 15%
Chloride	Target value \pm 5%		
Cholesterol, total	Target value \pm 10%		
Cholesterol, high dens. lipoprotein	Target value \pm 30%		
Creatine kinase	Target value \pm 30%		
Creatine kinase isoenzymes	MB elevated (present or absent) or Target value \pm 3 SD Creatinine		
Creatinine	Target value \pm 0.3 mg/dL or \pm 15% (greater)		
Glucose	Target value \pm 6 mg/dL or \pm 10% (greater)		
Iron, total	Target value \pm 20%		
LDH	Target value \pm 20%		
LDH isoenzymes	LDH1/LDH2 (+ or -) or Target value \pm 30%		
Magnesium	Target value \pm 25%		
Potassium	Target value \pm 0.5 mmol/L		
Sodium	Target value \pm 4 mmol/L		
Total protein	Target value \pm 10%		
Triglycerides	Target value \pm 25%		
Urea Nitrogen	Target value \pm 2 mg/dL or \pm 9% (greater)		
Uric acid	Target value \pm 17%		

European biologic goals and biologic allowable total errors			
Quantity	Imprecision %	Inaccuracy %	Total Error %
Albumin	1.4 (1.8)	1.1 (2.8)	3.4 (5.8)
Bicarbonate	2.3 (4.9)	1.6 (4.6)	5.4 (12.7)
Bilirubins	11.3	9.8	28.4
Calcium	0.9 (1.5)	0.7 (1.8)	2.2 (4.3)
Chloride	0.7 (1.0)	0.5 (1.4)	1.7 (3.0)
Cholesterol	2.7	4.1	8.6
Creatinine	2.2	2.8 (4.4)	6.4 (8.0)
Glucose	2.2	1.9 (4.4)	5.5 (8.0)
Iron	15.9	8.9	35.1
Lithium	3.6	4.2	10.1
Magnesium	1.1 (2.6)	1.6 (2.2)	3.4 (6.5)
Phosphate	4.0	3.1 (8.0)	9.7 (14.6)
Potassium	2.4	1.6 (4.8)	5.6 (8.4)
Proteins	1.4	1.5 (2.8)	3.8 (5.1)
Triacylglycerols	11.5	15.6	34.6
Urea	6.3	5.3	15.7
Urate	4.2	4.0 (8.4)	10.9 (15.3)
Acid phosphatase	4.5	2.1 (9.0)	9.5 (16.4)
Alanine aminotransferase	13.6	13.6	36.0
Alkaline phosphatase	3.4	6.4	12.0
Amylase	3.7	6.5 (7.4)	12.6 (13.5)
Aspartate aminotransferase	7.2	6.2	18.0
Creatine kinase	20.7	19.8	54.0
Gamma-Glutamyl transferase	7.4	21.8	34.0
Lactate dehydrogenase	3.9	4.1 (7.8)	10.5 (14.2)

TRABAJO PRÁCTICO N° 4
VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN Y VERACIDAD DE UN
MÉTODO ANALÍTICO.

EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS CUANTITATIVOS

Objetivos de la Actividad Práctica

El propósito de esta actividad práctica es:

- i) Verificar la precisión y veracidad de una metodología de interés en bioquímica clínica.

Aspectos generales

Como se ha mencionado previamente, la Verificación de Métodoses realizada por el laboratorio bioquímico con el propósito de evidenciar que el reactivo o equipo adquirido reproduce los parámetros analíticos informados por el fabricante. Las estrategias experimentales que se emplean para Validar y Verificar una metodología analítica son básicamente las mismas, pero los protocolos de verificación son esencialmente más simples (menos esfuerzo, menos tiempo y menor cantidad de datos) aunque suficientemente rigurosos como para obtener conclusiones estadísticamente válidas. Los parámetros analíticos más relevantes en la Verificación del desempeño de los métodos en bioquímica clínica son la precisión y veracidad. La guía EP15-A2 de la CLSI (*User verification of performance for precision and trueness*) proporciona protocolos para verificar estos dos parámetros analíticos en métodos que han sido *previamente validados por el fabricante*. Si el protocolo es exitoso el laboratorio acepta el método en base a las especificaciones en términos precisión y exactitud declaradas por el fabricante. Esta guía asume que el fabricante realizó la validación del método a evaluar siguiendo los protocolos de las guías EP5-A2 (precisión) y EP9-A2 (veracidad). Otra aplicación de la guía EP15-A2 es corroborar el desempeño adecuado del método en rutina de manera posterior a haber realizado acciones correctivas en el mismo por obtener resultados no satisfactorios en una participación en un programa de control externo de calidad.

Protocolo de trabajo

El experimento propuesto permite evaluar repetibilidad, precisión intra-laboratorio y veracidad (estimada por mediciones del bias) relativa a un estándar aceptado y puede ser completado en 5 días operativos. Para ello, se tienen en cuenta las siguientes etapas:

1) *Período de familiarización del método:*

El período de familiarización con el método requiere del tiempo para que el bioquímico se familiarice con el funcionamiento de los equipos y el proceso de medición la técnica y se detecten todos los posibles errores operativos que puedan actuar como una fuente de variabilidad de los resultados.

En este período se aplicará una estrategia de control de calidad interno (ya sea la recomendada por el fabricante o la diseñada por el laboratorio si validó el método previamente), con la finalidad de establecer si el método está operando bajo condiciones de estabilidad analítica, lo cual adjudica la validez a cada corrida analítica efectuada.

2) *Experimento de evaluación de la precisión:*

a) Diseño experimental

Según la guía EP15-A2 de la CLSI, el experimento de verificación de la precisión se debe realizar en al menos dos concentraciones del analito, las cuales se recomienda que sean cercanas a los niveles de decisión médica. Para algunos analitos, es importante realizar la evaluación de la precisión en los límites inferior y superior del intervalo de referencia. Normalmente, en los experimentos de verificación la selección se realiza a concentraciones cercanas a las informadas por el fabricante durante la validación por él realizada. Para cada nivel de concentración seleccionado, se realiza una corrida analítica por día, con tres replicados por corrida, durante 5 días operativos. Pueden utilizarse los siguientes materiales: muestras control (diferentes a las utilizadas en el control de calidad interno), muestras de pacientes analizadas previamente, ó material adecuado con valores de concentración conocida para cada analito. Es necesario que el material utilizado para este ensayo de precisión respete la matriz de las muestras de los pacientes.

b) Estimación de la repetibilidad y de la precisión intra-laboratorio

Luego de la recolección de los datos, se procede al cálculo de las estimaciones de la repetibilidad (Precisión intra-corrida) y precisión intra-laboratorio que se realizan por separado para cada nivel de concentración evaluado.

Nota: La nomenclatura " σ_r " y " σ_i " se utilizan para referirse a la "repetibilidad" y "precisión intra-laboratorio" estipuladas por el fabricante, respectivamente. La nomenclatura " s_r " y " s_i " se utilizan para referirse a la "repetibilidad" y "precisión intra-laboratorio" estimadas por el laboratorio, respectivamente.

✓ Estimación de la repetibilidad (s_r): (Ecuación 1)

$$s_r = \sqrt{\frac{\sum_{d=1}^D \sum_{i=1}^n (x_{di} - \bar{x}_d)^2}{D(n-1)}}$$

Donde,

D = Número total de días (cinco)

n = Número total de repeticiones por día (tres)

x_{di} = Resultado de los repeticiones de cada día

\bar{x}_d = Promedio de todos los resultados del día d

✓ Estimación de la precisión intra-laboratorio (s_1): (Ecuación 2)

$$s_1 = \sqrt{\frac{n-1}{n} \times s_r^2 + s_b^2}$$

Donde,

n = Número de repeticiones por día (tres)

s_r^2 = Varianza de repetibilidad

s_b^2 = Varianza de las medias diarias (ver Ec. 3)

- El término s_b^2 se calcula según: (Ecuación 3)

$$s_b^2 = \frac{\sum_{d=1}^D (\bar{x}_d - \bar{\bar{x}})^2}{D-1}$$

Donde,

D = Número de días (cinco)

\bar{x}_d = Promedio de todos los resultados del día

$\bar{\bar{x}}$ = Promedio de todos los resultados (media total)

c) Comparación de la repetibilidad y de la precisión intra-laboratorio con las especificaciones de calidad del fabricante.

Para verificar la precisión de la metodología, las estimaciones de la repetibilidad y de la precisión intra-laboratorio deben compararse, por separado, con las especificaciones de calidad del fabricante. Este análisis se efectúa para cada nivel de concentración seleccionados para el experimento (mínimo dos niveles). En este sentido, es importante que los niveles de concentración sean cercanos a los informados por el fabricante.

✓ Especificaciones de precisión del fabricante

Si el fabricante informa las especificaciones de precisión en términos de CV%, se debe convertir cada CV% (de repetibilidad y de precisión intermedia) a desviación estándar para cada concentración evaluada utilizando la media total (obtenida por el laboratorio) de los resultados del experimento:

Desviación estandar del fabricante para repetibilidad: (Ecuación 4)

$$\sigma_r = \frac{CV\%_r \times \bar{\bar{x}}}{100}$$

Donde,

$CV\%_r$ = CV% del fabricante para repetibilidad

$\bar{\bar{x}}$ = Promedio de todos los resultados (media total) del experimento (obtenida por el laboratorio)

Desviación estandar del fabricante para precisión intra-laboratorio: (Ecuación 5)

$$\sigma_1 = \frac{CV\%_1 \times \bar{\bar{x}}}{100}$$

Donde,

$CV\%_1$ = CV% del fabricante para precisión intra-laboratorio

$\bar{\bar{x}}$ = Promedio de todos los resultados (media total) del experimento

✓ Comparación de la repetibilidad con las especificaciones de calidad del fabricante

La verificación de la repetibilidad se realiza comparando la desviación estándar de repetibilidad estimada por el laboratorio con la informada por el fabricante.

- $s_r \leq \sigma_r$

Si la desviación estándar estimada de la repetibilidad s_r (Ecuación 1) es menor o igual a la desviación estándar de repetibilidad especificada por el fabricante σ_r (Ecuación 4), el laboratorio cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de repetibilidad.

- $s_r > \sigma_r$

Si la desviación estándar estimada de la repetibilidad s_r (Ecuación 1) es mayor a la desviación estándar de repetibilidad especificada por el fabricante σ_r (Ecuación 4), se realiza un test de significancia para determinar si ambas desviaciones estándar de repetibilidad son significativamente diferentes. Para ello se calcula el **valor de verificación** de repetibilidad (Ecuación 6):

$$\frac{\sigma_r \times \sqrt{C}}{\sqrt{v}}$$

Donde, v son los grados de libertad de repetibilidad que se calculan como $D(n-1)$, siendo D el número de días del experimento y n el número de replicados por corrida (día). Para un experimento de 5 días con tres replicados por día, $v = 10$.

C es el valor de chi-cuadrado crítico para v grados de libertad, el cual se obtiene de la tabla de distribución de chi-cuadrado de $\alpha = 0,05$ para el número de niveles (concentraciones) evaluadas (usualmente 2). (ver Tabla 1)

- **$s_r \leq$ Valor de verificación de repetibilidad**

Si la desviación estándar estimada de la repetibilidad s_r (Ecuación 1) es menor o igual al valor de verificación de la repetibilidad (Ecuación 6), no existen diferencias significativas entre la estimación de la repetibilidad del laboratorio y la informada por el fabricante y el laboratorio cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de repetibilidad.

- **$s_r >$ Valor de verificación de repetibilidad**

Si la desviación estándar estimada de la repetibilidad s_r (Ecuación 1) es mayor al valor de verificación de la repetibilidad (Ecuación 6), existen diferencias significativas entre la estimación de la repetibilidad del laboratorio y la informada por el fabricante y el laboratorio no cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de repetibilidad.

En este último caso, se realizan dos corridas adicionales (por triplicado) y recalculan los datos para aumentar la robustez del análisis estadístico. Si aún en estas condiciones no se cumple con las especificaciones de calidad, el método no es verificado en términos de repetibilidad y no puede implementarse en rutina debiendo evaluarse las causas de error, realizar acciones correctivas y verificar nuevamente.

✓ Comparación de la precisión intra-laboratorio con las especificaciones de calidad del fabricante

La verificación de la precisión intra-laboratorio se realiza comparando la desviación estándar intra-laboratorio estimada por el laboratorio con la informada por el fabricante.

- **$s_1 \leq \sigma_1$**

Si la desviación estándar estimada intra-laboratorio s_1 (Ecuación 2) es menor o igual a la desviación estándar intra-laboratorio especificada por el fabricante σ_1 (Ecuación 5), el laboratorio cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de precisión intra-laboratorio.

- **$s_1 > \sigma_1$**

Si la desviación estándar estimada intra-laboratorio s_1 (Ecuación 2) es mayor a la desviación estándar intra-laboratorio especificada por el fabricante σ_1 (Ecuación 5), se realiza un test de significancia para determinar si ambas desviaciones estándar intra-laboratorio son significativamente diferentes. Para ello se calcula el **valor de verificación** intra-laboratorio (Ecuación 7):

$$\frac{\sigma_1}{\sqrt{T}} \times \sqrt{C}$$

Donde,

T son los grados de libertad intra-laboratorio (ver Ec. 8)

C es el valor de chi-cuadrado crítico para T grados de libertad, el cual se obtiene de la tabla de distribución de chi-cuadrado de $\alpha = 0,05$ para el número de niveles (concentraciones) evaluadas (usualmente 2). (ver Tabla 1)

- T se calcula según: (Ecuación 8)

$$T = \frac{\left((n-1)S_r^2 + (nS_b^2)\right)^2}{\left(\frac{n-1}{D}\right)S_r^4 + \left(\frac{n^2(S_b^2)^2}{D-1}\right)}$$

Donde,

D = Número de días (cinco)

n = Número de replicados por día (tres)

s_r = Desviación estándar de repetibilidad (ver Ec. 1)

s_b² = Varianza de las medias diarias (ver Ec. 3)

○ **S₁ ≤ Valor de verificación intra-laboratorio**

Si la desviación estándar estimada de la precisión intra-laboratorio s₁ (Ecuación 2) es menor o igual al valor de verificación intra-laboratorio (Ecuación 7), no existen diferencias significativas entre la estimación de la precisión intra-laboratorio del laboratorio y la informada por el fabricante y el laboratorio cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de precisión intra-laboratorio.

○ **S₁ > Valor de verificación intra-laboratorio**

Si la desviación estándar estimada de la precisión intra-laboratorio s₁ (Ecuación 2) es mayor al valor de verificación intra-laboratorio (Ecuación 7), existen diferencias significativas entre la estimación de la precisión intra-laboratorio del laboratorio y la informada por el fabricante y el laboratorio no cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de precisión intra-laboratorio.

En este último caso, se realizan dos corridas adicionales (por triplicado) y recalculan los datos para aumentar la robustez del análisis estadístico. Si aún en estas condiciones no se cumple con las especificaciones de calidad, el método no es verificado en términos de precisión intralaboratorio y no puede implementarse en rutina debiendo evaluarse las causas de error, realizar acciones correctivas y verificarse nuevamente.

Finalmente, si se cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de repetibilidad y precisión intra-laboratorio a cada concentración evaluada, el laboratorio verifica la precisión del método; y está en condiciones de continuar con la siguiente etapa de verificación de métodos.

Tabla 1. Porcentajes de la distribución chi-cuadrado para niveles de concentración (2, 3 y 4) asociados a un $\alpha = 0,05$.

Grados de libertad	Número de niveles de concentración		
	2	3	4
3	9.35	10.24	10.86
4	11.14	12.09	12.76
5	12.83	13.84	14.54
6	14.45	15.51	16.24
7	16.01	17.12	17.88
8	17.53	18.68	19.48
9	19.02	20.21	21.03
10	20.48	21.71	22.56
11	21.92	23.18	24.06
12	23.34	24.63	25.53
13	24.74	26.06	26.98
14	26.12	27.48	28.42
15	27.49	28.88	29.84
16	28.85	30.27	31.25
17	30.19	31.64	32.64
18	31.53	33.01	34.03
19	32.85	34.36	35.40
20	34.17	35.70	36.76
21	35.48	37.04	38.11
22	36.78	38.37	39.46
23	38.08	39.68	40.79
24	39.36	41.00	42.12
25	40.65	42.30	43.35

3) *Experimento de evaluación de la veracidad:*

El protocolo de la guía de la CLSI propone dos procedimientos para la verificación de la veracidad de una metodología. Ambos procedimientos involucran el cálculo del bias que es expresado como la diferencia entre el promedio de los resultados de las mediciones del laboratorio y un valor aceptado como referencia. Los procedimientos se diferencian en la obtención de este valor de referencia, que puede realizarse ya sea por comparación de métodos utilizando muestras de pacientes o por ensayos de recuperación empleando materiales de referencia. Para realizar la verificación de la veracidad de la metodología se selecciona uno de estos procedimientos descritos en el protocolo, el diseño experimental dependerá del procedimiento seleccionado:

a) Comparación de métodos utilizando muestras de pacientes.

Constituye el procedimiento de elección para una evaluación inicial de la veracidad de una metodología en el laboratorio y está recomendado cuando existe un alto grado de concordancia entre el método a evaluar y el comparativo. En este procedimiento, la elección del método comparativo es crítica. En la verificación de la veracidad contra especificaciones de calidad del fabricante, se requiere que el método comparativo sea el utilizado por el fabricante en la validación. Si el método a verificar es el que está en rutina, pero modificado o utilizando otro equipamiento, como método comparativo puede utilizarse el de rutina con las especificaciones de veracidad del fabricante del mismo.

➤ *Diseño experimental:*

El experimento consiste en la medición de un mínimo de 20 muestras de pacientes por el método a evaluar y por el método comparativo.

- El experimento de verificación de la veracidad debe realizarse en paralelo con el experimento de verificación de la precisión.
- Se recomienda medir de 5 a 7 muestras por día durante 3 o 4 días.
- Las muestras deben contener concentraciones del analito que cubran pero no excedan el intervalo de medición del método.
- Deben excluirse muestras que contengan sustancias identificadas por el fabricante como interferentes.
- Los resultados de cada muestra por ambos métodos deben examinarse individualmente para determinar si existe entre ellos una diferencia mayor que la observada con las otras muestras. En este caso se recomienda rechazar esa muestra y añadir una nueva para el análisis.
- Las mediciones de las muestras deben realizarse lo mas cercano posible al día de su recolección (preferiblemente el mismo día).
- Si las mediciones por el método a evaluar y el comparativo se realizan en el mismo laboratorio o laboratorios cercanos, las mediciones de las muestras por ambos métodos deben realizarse en el mismo día, dentro de las 4 horas de diferencia entre ellos.
- Si las mediciones por el método a evaluar y el comparativo se realizan en laboratorios geográficamente separados se recomienda el almacenamiento (en *freezer*) de las muestras. El descongelamiento y la medición por ambos métodos debe realizarse en el mismo momento (como máximo 2 horas de diferencia).

- Durante las mediciones, el método a evaluar y el comparativo deben estar operando bajo condiciones de estabilidad analítica. Muestras de corridas analíticas rechazadas deben medirse nuevamente.

➤ *Cálculo del bias:*

Luego de obtener los resultados de las mediciones de las muestras por el método a evaluar y por el método comparativo, se calcula el bias de cada muestra individual, en unidades y porcentual.

Bias individual en unidades (b_i): (Ecuación 9)

$$b_i = (\text{resultado del método evaluado} - \text{resultado del método comparativo})$$

Bias individual porcentual ($\%b_i$): (Ecuación 10)

$$\%b_i = \frac{(\text{resultado del método evaluado} - \text{resultado del método comparativo})}{\text{resultado del método comparativo}} \times 100$$

Los valores de bias individual (en unidades o porcentual) deben graficarse en función de los resultados del método comparativo para cada muestra para examinar si la diferencia entre ambos métodos es relativamente constante en el intervalo de concentraciones evaluado.

- Si se observa que los valores de bias individual *versus* concentración son constantes, se calcula el **bias medio** (en unidades y porcentual) que representa el promedio de las diferencias entre los métodos.
- Si los valores de bias individual *versus* concentración no son constantes, los datos se dividen en dos segmentos y se calcula el **bias medio** (en unidades y porcentual) para cada uno de ellos.
- Si los bias individuales muestran un cambio progresivo con la concentración, no puede calcularse el bias medio y se necesitan mas datos para evaluar la veracidad, debiendo seleccionarse otro procedimiento para la verificación o realizar la validación, por ejemplo con la guía EP9-A2.

Bias medio en unidades \bar{b} : (Ecuación 11)

$$\bar{b} = \frac{\sum_{i=1}^I b_i}{n}$$

Bias medio porcentual $\overline{\%b}$: (Ecuación 12)

$$\overline{\%b} = \frac{\sum_{i=1}^I \%b_i}{n}$$

➤ *Comparación del bias con las especificaciones del fabricante:*

Para la verificación de la veracidad del método, el bias medio (o cada uno de los bias medios si se dividieron los datos en dos segmentos) debe compararse con el bias informado por el fabricante.

- \bar{b} (o $\% \bar{b}$) y β (o $\% \beta$) del mismo signo y $\bar{b} \leq \beta$ (o $\% \bar{b} \leq \% \beta$)

Si el bias medio en unidades b (Ecuación 11) o porcentual $\%b$ (Ecuación 12) es del mismo signo y es menor o igual (en valor absoluto) al bias especificado por el fabricante (en unidades β o porcentual $\% \beta$), el laboratorio cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de veracidad.

- \bar{b} (o $\% \bar{b}$) y β (o $\% \beta$) de distinto signo ó $\bar{b} > \beta$ (o $\% \bar{b} > \% \beta$)

- Si el bias medio en unidades b (Ecuación 11) o porcentual $\%b$ (Ecuación 12) es de distinto signo ó es mayor (en valor absoluto) al bias especificado por el fabricante (en unidades β o porcentual $\% \beta$), se realiza un test de significancia para determinar si los bias son significativamente diferentes. Para ello se calculan el **intervalo de verificación** del bias (Ecuaciones 13 y 14):

Intervalo de verificación del bias en unidades: (Ecuación 13)

$$\beta \pm \frac{\tau \times S_{\bar{b}}}{\sqrt{n}}$$

Donde,

β es el bias del fabricante en unidades

τ es el valor de t crítico para $n-1$ grados de libertad

n es el número de muestras de pacientes

$S_{\bar{b}}$ es la desviación estándar del bias en unidades (ver Ec. 15)

Intervalo de verificación del bias porcentual: (Ecuación 14)

$$\% \beta \pm \frac{\tau \times S_{\% \bar{b}}}{\sqrt{n}}$$

Donde,

$\% \beta$ es el bias del fabricante porcentual

τ es el valor de t crítico para $n-1$ grados de libertad

n es el número de muestras de pacientes

$S_{\% \bar{b}}$ es la desviación estándar del bias porcentual (ver Ec. 16)

- Las desviaciones estándar del bias en unidades y porcentual se calculan según:

Desviación estándar del bias en unidades: (Ecuación 15)

$$s_{\bar{b}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (b_i - \bar{b})^2}{n - 1}}$$

Desviación estándar del bias porcentual: (Ecuación 16)

$$s_{\%b} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^I (\%b_i - \overline{\%b})^2}{n - 1}}$$

Conclusiones de la comparación del bias con el intervalo de verificación:

○ **\bar{b} (o $\overline{\%b}$) dentro de los límites de verificación del bias**

Si el bias medio en unidades (Ecuación 11) o porcentual (Ecuación 12) está dentro de los respectivos límites de verificación del bias (Ecuación 13 o 14, respectivamente), no existen diferencias significativas entre el bias del laboratorio y el informado por el fabricante y el laboratorio cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de veracidad.

En este caso el laboratorio **puede** decidir realizar test estadísticamente mas robustos realizando nuevamente la verificación con mayor número de muestras de pacientes (10 a 20 muestras adicionales).

○ **\bar{b} (o $\overline{\%b}$) fuera de los límites de verificación del bias**

Si el bias medio en unidades (Ecuación 11) o porcentual (Ecuación 12) está fuera de los respectivos límites de verificación del bias (Ecuación 13 o 14, respectivamente), existen diferencias significativas entre el bias del laboratorio y el informado por el fabricante y el laboratorio no cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de veracidad.

En este caso el laboratorio **debe** realizar test estadísticamente mas robustos realizando nuevamente la verificación con mayor número de muestras de pacientes (10 a 20 muestras adicionales) o validar la veracidad según los lineamientos de la guía EP9-A2 de la CLSI.

b) **Ensayos de Recuperación empleando materiales de referencia.**

Este procedimiento es conveniente para verificar la veracidad de un método que ya ha sido implementado en rutina. También se utiliza cuando no ha podido realizarse la verificación por comparación de muestras de pacientes, ya sea porque no se cuenta con el

método comparativo utilizado por el fabricante o porque no existe alta concordancia entre el método a evaluar y el comparativo.

Materiales de referencia (MR) con valores asignados para los distintos analitos pueden obtenerse de varias fuentes. Generalmente, los MR son fabricados a partir de muestras de fluidos humanos con aditivos para alcanzar la concentración deseada y son procesados para su estabilidad. Por los requerimientos de su fabricación, los MR poseen una matriz diferente a la de una auténtica muestra humana. Por lo que, sólo podrán utilizarse para la verificación de la veracidad MR que han sido evaluados específicamente y son apropiados para el método a evaluar.

Fuentes de materiales que pueden ser utilizados para la verificación de la veracidad:

- Suero humano fresco congelado u otro material humano no adulterado. Para algunos analitos, existen MR certificados provenientes de entidades internacionales como el NIST (*National Institute of Standards and Technology*). Una lista de estos materiales está disponible en <http://www.bipm.org/jctlm/>.
- Material de referencia de programas de ensayos de aptitud (control de calidad externo). Los valores asignados representan el promedio de los valores obtenidos por un gran número de laboratorios (incluyendo diferentes lotes de reactivos y calibradores).
- Material provisto por el fabricante del método para la verificación de la veracidad o el control de calidad interno. Son materiales diseñados específicamente para el método a evaluar pero generalmente no pueden utilizarse para otros métodos.
- Materiales usados en programas inter-laboratorio. Estos materiales son medidos por un gran número de laboratorios y la media de los resultados de un grupo particular puede utilizarse como valor asignado (mínimo de 10 laboratorios en el grupo).
- Materiales provistos por vendedores que no son los fabricantes de los métodos, que tienen un valor asignado para un número determinado de procedimientos de medición. Son similares a los ensayos de aptitud pero generalmente tienen menos laboratorios participantes, lo que incrementa la incertidumbre del valor asignado.
- Materiales para los cuales las concentraciones de los analitos pueden ser fijadas a valores indicados.

➤ *Diseño experimental:*

El experimento consiste en la medición de materiales de referencia (MR) que contienen valores asignados del analito.

- Seleccionar el mejor MR apropiado para el método a evaluar.
- Preparar el material de acuerdo a las instrucciones del fabricante.
- Se deben medir por lo menos dos concentraciones del analito. Es preferible utilizar más concentraciones para cubrir, pero no exceder, el intervalo de medición.
- Las concentraciones seleccionadas pueden representar los extremos del intervalo de medición (concentración baja y concentración alta). Es preferible evaluar también concentraciones intermedias correspondientes a niveles de decisión médica.
- Asegurar que las concentraciones seleccionadas puedan ser medidas con buena precisión por el método a evaluar.

- Cada MR (MR correspondientes a cada concentración) se mide en 3 a 5 corridas por duplicado.
- El experimento de verificación de la veracidad puede realizarse en paralelo con el experimento de verificación de la precisión.
- Durante las mediciones, el método debe estar operando bajo condiciones de estabilidad analítica. MR de corridas analíticas rechazadas deben medirse nuevamente.

➤ *Cálculo del intervalo de verificación del bias:*

Luego de realizar las mediciones del MR seleccionado, se obtiene la media y desviación estándar del método a los diferentes niveles de concentración y se calcula el **intervalo de verificación del bias**. La verificación de la veracidad se realiza comparando el valor asignado del MR con los límites de verificación, asumiendo que el fabricante no tiene especificaciones de *bias* relativo al valor asignado (*bias*=0).

Intervalo de verificación del bias: (Ecuación 17)

$$\bar{x} \pm t_{(1-\alpha; 2n-1)} \times \sqrt{S_x^2 + EE^2}$$

Donde,

\bar{x} es la media de los resultados del laboratorio de las mediciones del MR.

t es el valor de t crítico para $2n-1$ grados de libertad, siendo 2 el número de replicados. (ver Tabla 2)

n es el número de corridas realizadas.

S_x es la desviación estándar de las mediciones del laboratorio del MR.

EE es el error estándar del MR.

El cálculo del error estándar (EE) del MR seleccionado para la verificación depende de la forma en que se ha determinado el valor asignado de ese MR, o de la información proporcionada por el fabricante:

- Si el fabricante proporciona el EE , la incertidumbre estándar o la incertidumbre estándar combinada (u) del valor asignado, este valor es el EE ($= u$).
- Si el fabricante informa el intervalo de confianza del 95% (IC) para el valor asignado, entonces el $EE = IC/2$.
- Si el fabricante informa la incertidumbre expandida del valor asignado (U), debe informar también el nivel de confianza (k) usado para calcularla, entonces el $EE = U/k$.
- Si el valor asignado del MR proviene de los resultados de un ensayo de aptitud (control de calidad externo), debe ser informada también la desviación estándar de los resultados (s) y el número de resultados por grupo (n), en este caso el $EE = s/\sqrt{n}$.
- Si el valor asignado del MR proviene de los resultados de un programa interlaboratorio, el cálculo del EE depende de la información que brinda el programa. Idealmente, el

programa debería informar la desviación estándar (s) de los resultados de cada laboratorio diferentes y el número de laboratorios (n) del mismo grupo. Sin embargo, puede informar solo la s total y el n total de todos los laboratorios participantes. En ambos casos, el EE = s/\sqrt{n} .

Conclusiones de la comparación del valor asignado con el intervalo de verificación:

- **Valor asignado del MR dentro de los límites de verificación**

Si el intervalo de verificación (Ecuación 17) incluye al valor asignado el laboratorio cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de veracidad.

En este caso, si el valor asignado (aunque está dentro del intervalo) es muy diferente a la media, el laboratorio **puede** realizar test estadísticamente mas robustos realizando nuevamente la verificación con más MR en diferentes corridas (2 a 5 MR adicionales).

- **Valor asignado del MR fuera de los límites de verificación**

Si el intervalo de verificación (Ecuación 17) no incluye al valor asignado, el laboratorio no cumple con las especificaciones de calidad del fabricante en términos de veracidad.

En este caso, el laboratorio **debe** realizar test estadísticamente mas robustos realizando nuevamente la verificación con más MR en diferentes corridas (2 a 5 MR adicionales) o validar la veracidad con la guía EP9-A2.

Tabla 2. Distribución de Student (t). Área bajo la curva de las dos colas.

g. l.	0,20	0,10	0,05	0,02	0,01
1	3,078	6,314	12,706	31,821	63,657
2	1,886	2,920	4,303	6,965	9,925
3	1,638	2,353	3,182	4,541	5,841
4	1,533	2,132	2,776	3,747	4,604
5	1,476	2,015	2,571	3,365	4,032
6	1,440	1,943	2,447	3,143	3,707
7	1,415	1,895	2,365	2,998	3,499
8	1,397	1,860	2,306	2,896	3,355
9	1,383	1,833	2,262	2,821	3,250
10	1,372	1,812	2,228	2,764	3,169
11	1,363	1,796	2,201	2,718	3,106
12	1,356	1,782	2,179	2,681	3,055
13	1,350	1,771	2,160	2,650	3,012
14	1,345	1,761	2,145	2,624	2,977
15	1,341	1,753	2,131	2,602	2,947
16	1,337	1,746	2,120	2,583	2,921
17	1,333	1,740	2,110	2,567	2,898
18	1,330	1,734	2,101	2,552	2,878
19	1,328	1,729	2,093	2,539	2,861
20	1,325	1,725	2,086	2,528	2,845
21	1,323	1,721	2,080	2,518	2,831
22	1,321	1,717	2,074	2,508	2,819
23	1,319	1,714	2,069	2,500	2,807
24	1,318	1,711	2,064	2,492	2,797
25	1,316	1,708	2,060	2,485	2,787
26	1,315	1,706	2,056	2,479	2,779
27	1,314	1,703	2,052	2,473	2,771
28	1,313	1,701	2,048	2,467	2,763
29	1,311	1,699	2,045	2,462	2,756
30	1,310	1,697	2,042	2,457	2,750
40	1,303	1,684	2,021	2,423	2,704
60	1,296	1,671	2,000	2,390	2,660
120	1,289	1,658	1,980	2,358	2,617

EJERCICIOS PRÁCTICOS

Ejercicio N°1: Un laboratorio de análisis clínicos, se propone verificar la precisión y veracidad de su metodología para medir glucosa (reacción de la glucosa oxidasa) a las concentraciones (NDM) de 70 y 240 mg/dL, siguiendo las normativas estipuladas en la guía EP15-A2 de la CLSI. Se obtuvieron los siguientes datos:

Experimento de precisión:

Tabla I.

NDM = 70 mg/dL	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Replicado 1	71	72	70	71	70
Replicado 2	71	73	71	72	70
Replicado 3	72	72	71	71	71
NDM = 240 mg/dL	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Replicado 1	242	245	246	245	246
Replicado 2	243	243	242	238	238
Replicado 3	247	240	239	241	240

Experimento de veracidad por comparación de muestras de pacientes:

Tabla II.

Muestra #	Método evaluado	Método comparativo
1	76	77
2	127	121
3	256	262
4	303	294
5	29	25
6	345	348
7	42	41
8	154	154
9	398	388
10	93	92
11	240	239
12	72	69
13	312	308
14	99	101
15	375	375
16	168	162
17	59	54
18	183	185
19	213	204
20	436	431

1-1) VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN

1-1-a) Estime la repetibilidad (s_r) y la precisión intra-laboratorio (s_1) para el método a verificar a cada concentración evaluada.

NDM	Media Total (mg/dl)	s_r (mg/dl)	s_1 (mg/dl)
70 mg/dL			
240 mg/dL			

1-1-b) Teniendo en cuenta los valores de CV% especificados por el fabricante para el método a verificar y la media total del laboratorio, calcule la repetibilidad (σ_r) y la precisión intra-laboratorio (σ_1) informada por el fabricante a cada concentración evaluada.

NDM	Media Total (mg/dl)	Repetibilidad (CV%)	σ_r	Precisión intra-laboratorio (CV%)	σ_1
70 mg/dL		1,0		1,2	
240 mg/dL		1,3		1,5	

1-1-c) Con las estimaciones de la precisión calculadas complete las siguientes tablas y determine si el laboratorio verifica las especificaciones del fabricante de repetibilidad y precisión intra-laboratorio para el método a cada nivel de concentración.

Glucosa NDM: 70 mg/dL		Media total =
REPETIBILIDAD		
$s_r =$	Grados de Libertad (ν) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_r =$	Valor de verificación de $s_r =$	
<input type="checkbox"/> $s_r \leq \sigma_r$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_r > \sigma_r$	<input type="checkbox"/> $s_r \leq$ valor de verificación de s_r	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_r >$ valor de verificación de s_r	No cumple con las especificaciones operativas
PRECISIÓN INTRA-LABORATORIO		
$s_1 =$	Grados de Libertad (T) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_1 =$	Valor de verificación de $s_1 =$	
<input type="checkbox"/> $s_1 \leq \sigma_1$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_1 > \sigma_1$	<input type="checkbox"/> $s_1 \leq$ valor de verificación de s_1	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_1 >$ valor de verificación de s_1	No cumple con las especificaciones operativas

- i) ¿El laboratorio verifica la repetibilidad y precisión intra-laboratorio con respecto a las especificaciones del fabricante para el nivel de concentración de 70 mg/dl?

Glucosa NDM: 240 mg/dL		Media total =
REPETIBILIDAD		
S_r =	Grados de Libertad (v) =	Valor crítico (C) =
σ_r =	Valor de verificación de s_r =	
<input type="checkbox"/> S_r ≤ σ_r	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> S_r > σ_r	<input type="checkbox"/> S_r ≤ valor de verificación de s_r	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> S_r > valor de verificación de s_r	No cumple con las especificaciones operativas
PRECISIÓN INTRA-LABORATORIO		
S₁ =	Grados de Libertad (T) =	Valor crítico (C) =
σ₁ =	Valor de verificación de s₁ =	
<input type="checkbox"/> S₁ ≤ σ₁	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> S₁ > σ₁	<input type="checkbox"/> S₁ ≤ valor de verificación de s₁	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> S₁ > valor de verificación de s₁	No cumple con las especificaciones operativas

- ii) ¿El laboratorio verifica la repetibilidad y precisión intra-laboratorio con respecto a las especificaciones del fabricante para el nivel de concentración de 240 mg/dl?

- iii) ¿El laboratorio verifica la precisión del método con respecto a las especificaciones del fabricante? ¿Puede continuar con el protocolo de verificación?

1-2) VERIFICACIÓN DE LA VERACIDAD

1-2-1) Calcule la media del bias (en valor absoluto y porcentual) entre el método a evaluar y el comparativo con sus respectivos desviaciones estándares.

1-2-2) Grafique el bias entre el método a evaluar y el comparativo en función del método comparativo. Indique en el mismo las líneas correspondientes a la media del bias y al bias ideal (cero).

1-2-3) Complete la siguiente tabla y determine si el laboratorio verifica las especificaciones del fabricante de veracidad para el método, considerando que el fabricante informa un bias de 2 mg/dl para la concentración de glucosa de 212 mg/dl.

Glucosa			
b =		%b =	
β =		%β =	
Sb =	t =	S%b =	t =
Lim. Inf. Verif. =	Lim. Sup. Verif. =	Lim. Inf. Verif. % =	Lim. Sup. Verif. % =
<input type="checkbox"/> b(ob%) y $\beta(o\%\beta)$ del mismo signo y <input type="checkbox"/> $b \leq \beta$ (o $b\% \leq \%\beta$)		Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> b(o b%) y $\beta(o\beta\%)$ de distinto signo ó <input type="checkbox"/> $b > \beta$ (o $b\% > \%\beta$)		<input type="checkbox"/> b(ob%) dentro de los límites de verificación	Cumple con las especificaciones operativas
		<input type="checkbox"/> b (ob%) fuera de los límites de verificación	No cumple con las especificaciones operativas

- i) ¿El laboratorio verifica la veracidad del método con respecto a las especificaciones del fabricante? ¿Puede implementar el método en rutina?

Ejercicio N°2: Un laboratorio de hematología, se propone verificar la precisión de su metodología para medir globulos blancos (metodología automatizada) a las concentraciones de 2500/μl, 7800/μl y 17000/μl, siguiendo las normativas estipuladas en la guía EP15-A2 de la CLSI. Se obtuvieron los siguientes datos:

Experimento de precisión:

Tabla III.

NDM = 2500/μl	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Replicado 1	2500	2600	2700	2500	2500
Replicado 2	2800	2500	2600	2600	2600
Replicado 3	2800	2700	2600	2400	2500
NDM = 7800/μl	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Replicado 1	7800	7800	7700	7800	7800
Replicado 2	7700	7900	7700	7800	8000
Replicado 3	7600	7700	7900	7600	7900
NDM = 17000/μl	Corrida 1	Corrida 2	Corrida 3	Corrida 4	Corrida 5
Replicado 1	16900	17000	16600	17000	17000
Replicado 2	17000	16900	16900	17200	17000
Replicado 3	16800	16600	17000	17400	17100

Experimento de veracidad por ensayos de “recuperación” utilizando materiales de referencia proveniente de un Programa de Control de Calidad Externo (Interlaboratorio):

Tabla IV.

Corrida	Replicado	Muestra 1 (GB/μl) (Interlaboratorio)	Muestra 2 (GB/μl) (Interlaboratorio)
1	1	2520	16600
	2	2550	17000
2	3	2500	16800
	4	2480	17200
3	5	2550	17100
	6	2520	17500
4	7	2450	16900
	8	2480	17300
5	9	2550	17200
	10	2500	17600

2-1) VERIFICACIÓN DE LA PRECISIÓN

2-1-a) Estime la repetibilidad (s_r) y la precisión intra-laboratorio (s_1) para el método a verificar a cada concentración evaluada.

NDM	Media Total (GB/ μ l)	s_r (GB/ μ l)	s_1 (GB/ μ l)
2500/ μ l			
7800/ μ l			
17000/ μ l			

2-1-b) Teniendo en cuenta los valores de CV% especificados por el fabricante para el método a verificar y la media total del laboratorio, calcule la repetibilidad (σ_r) y la precisión intra-laboratorio (σ_1) informada por el fabricante a cada concentración evaluada.

NDM	Media Total (GB/ μ l)	Repetibilidad (CV% $_{or}$)	σ_r (GB/ μ l)	Precisión intra-laboratorio (CV% $_{o1}$)	σ_1 (GB/ μ l)
2500/ μ l		0,8		1,0	
7800/ μ l		1,1		1,2	
17000/ μ l		0,9		1,1	

2-1-c) Con las estimaciones de la precisión calculadas complete las siguientes tablas y determine si el laboratorio verifica las especificaciones del fabricante de repetibilidad y precisión intra-laboratorio para el método a cada nivel de concentración.

LEUCOCITOS: 2500/μl		Media total =
REPETIBILIDAD		
$s_r =$	Grados de Libertad (u) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_r =$	Valor de verificación de $s_r =$	
<input type="checkbox"/> $s_r \leq \sigma_r$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_r > \sigma_r$	<input type="checkbox"/> $s_r \leq$ valor de verificación de s_r	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_r >$ valor de verificación de s_r	No cumple con las especificaciones operativas
PRECISIÓN INTRA-LABORATORIO		
$s_1 =$	Grados de Libertad (T) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_1 =$	Valor de verificación de $s_1 =$	
<input type="checkbox"/> $s_1 \leq \sigma_1$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_1 > \sigma_1$	<input type="checkbox"/> $s_1 \leq$ valor de verificación de s_1	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_1 >$ valor de verificación de s_1	No cumple con las especificaciones operativas

- iv) ¿El laboratorio verifica la repetibilidad y precisión intra-laboratorio con respecto a las especificaciones del fabricante para el nivel de concentración de 2500 GB/ μ l?

LEUCOCITOS: 7800/μl		Media total =
REPETIBILIDAD		
$s_r =$	Grados de Libertad (u) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_r =$	Valor de verificación de $s_r =$	
<input type="checkbox"/> $s_r \leq \sigma_r$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_r > \sigma_r$	<input type="checkbox"/> $s_r \leq$ valor de verificación de s_r	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_r >$ valor de verificación de s_r	No cumple con las especificaciones operativas
PRECISIÓN INTRA-LABORATORIO		
$s_1 =$	Grados de Libertad (T) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_1 =$	Valor de verificación de $s_1 =$	
<input type="checkbox"/> $s_1 \leq \sigma_1$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_1 > \sigma_1$	<input type="checkbox"/> $s_1 \leq$ valor de verificación de s_1	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_1 >$ valor de verificación de s_1	No cumple con las especificaciones operativas

- v) ¿El laboratorio verifica la repetibilidad y precisión intra-laboratorio con respecto a las especificaciones del fabricante para el nivel de concentración de 7800 GB / μ l?

LEUCOCITOS: 17000/μl		Media total =
REPETIBILIDAD		
$s_r =$	Grados de Libertad (u) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_r =$	Valor de verificación de $s_r =$	
<input type="checkbox"/> $s_r \leq \sigma_r$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_r > \sigma_r$	<input type="checkbox"/> $s_r \leq$ valor de verificación de s_r	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_r >$ valor de verificación de s_r	No cumple con las especificaciones operativas
PRECISIÓN INTRA-LABORATORIO		
$s_1 =$	Grados de Libertad (T) =	Valor crítico (C) =
$\sigma_1 =$	Valor de verificación de $s_1 =$	
<input type="checkbox"/> $s_1 \leq \sigma_1$	Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> $s_1 > \sigma_1$	<input type="checkbox"/> $s_1 \leq$ valor de verificación de s_1	Cumple con las especificaciones operativas
	<input type="checkbox"/> $s_1 >$ valor de verificación de s_1	No cumple con las especificaciones operativas

vi) ¿El laboratorio verifica la repetibilidad y precisión intra-laboratorio con respecto a las especificaciones del fabricante para el nivel de concentración de 17000 GB / μ l?

vii) ¿El laboratorio verifica la precisión del método con respecto a las especificaciones del fabricante? ¿Puede continuar con el protocolo de verificación?

2-2) VERIFICACIÓN DE LA VERACIDAD

Para esta etapa de la verificación, el laboratorio utilizó muestras provenientes de un programa de control de calidad externo (MR con los valores asignados).

2-2-1) Calcule la media y s del método a los diferentes niveles de concentración; calcule el intervalo de verificación del bias para los dos niveles de concentración evaluados.

a) Datos:

Analito: Leucocitos ; Valor consenso = 2430/ μ l

s_a (grupál CCE) = 330/ μ l;

n (N° participantes) = 43

ANALITO	Media (Laboratorio) ((GB/ μ l))	s_x (Laboratorio) ((GB/ μ l))	Valor Consenso (CCE) ((GB/ μ l))	Intervalo de Verificación ((GB/ μ l))
Cumple con las especificaciones operativas?				
<input type="checkbox"/> Valor Consenso dentro del Intervalo de Verificación			Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> Valor Consenso fuera del Intervalo de Verificación			No cumple con las especificaciones operativas	

b) Datos:

Analito: Leucocitos ; Valor consenso = 17500/ μ l

"s" (grupál CCE) = 600/ μ l;

n (N° participantes) = 43

ANALITO	Media (Laboratorio) (GB/μl)	s _x (Laboratorio) (GB/μl)	Valor Consenso (CCE) (GB/μl)	Intervalo de Verificación (GB/μl)
Cumple con las especificaciones operativas?				
<input type="checkbox"/> Valor Consenso dentro del Intervalo de Verificación			Cumple con las especificaciones operativas	
<input type="checkbox"/> Valor Consenso fuera del Intervalo de Verificación			No cumple con las especificaciones operativas	

2-2-2) En base a los valores consenso remitidos por el Control de Calidad Externo (Ensayo Interlaboratorio, CCE) y los Intervalos de Verificación obtenidos, determine si el laboratorio “verifica” la veracidad para el método.

TRABAJO PRÁCTICO N° 5
CÁLCULO DEL ERROR TOTAL DE UN MÉTODO ANALÍTICO.
DISEÑO Y APLICACIÓN DE CONTROL DE CALIDAD
INTERNO

EVALUACIÓN DE MÉTODOS ANALÍTICOS CUANTITATIVOS

Objetivos de la Actividad Práctica

El propósito de esta actividad práctica es:

- i) Calcular el Error Total del método de análisis evaluado para establecer la aceptabilidad en función de los requerimientos de calidad y de los niveles de decisión médica requeridos para cada analito, y
- ii) Diseñar y aplicar estrategias de control de calidad interno basado en los parámetros analíticos de bias e imprecisión, obtenidos en la evaluación de métodos (validación/verificación), y en los requerimientos de calidad.

Aspectos generales

Como hemos mencionado en varias oportunidades la seguridad analítica de un método está supeditada a tres aspectos íntimamente relacionados entre sí: los Requerimientos de Calidad, la Validación/Verificación de Métodos y el Control de Calidad Interno y Externo.

Error Total:

El error total (ET) de una magnitud es la suma del EA (error aleatorio) y del ES (error sistemático) y representa el error máximo que puede tener la medición de un analito, siendo su cálculo el que se detalla a continuación:

$$ET = ES + EA,$$

Error Sistemático

El error sistemático comprende causas proporcionales (ESP) y constantes (ESC). Ambas causas constituyen el **Error Sistemático Total** (EST). Por lo tanto se deduce que:

$$EST = ESP + ESC$$

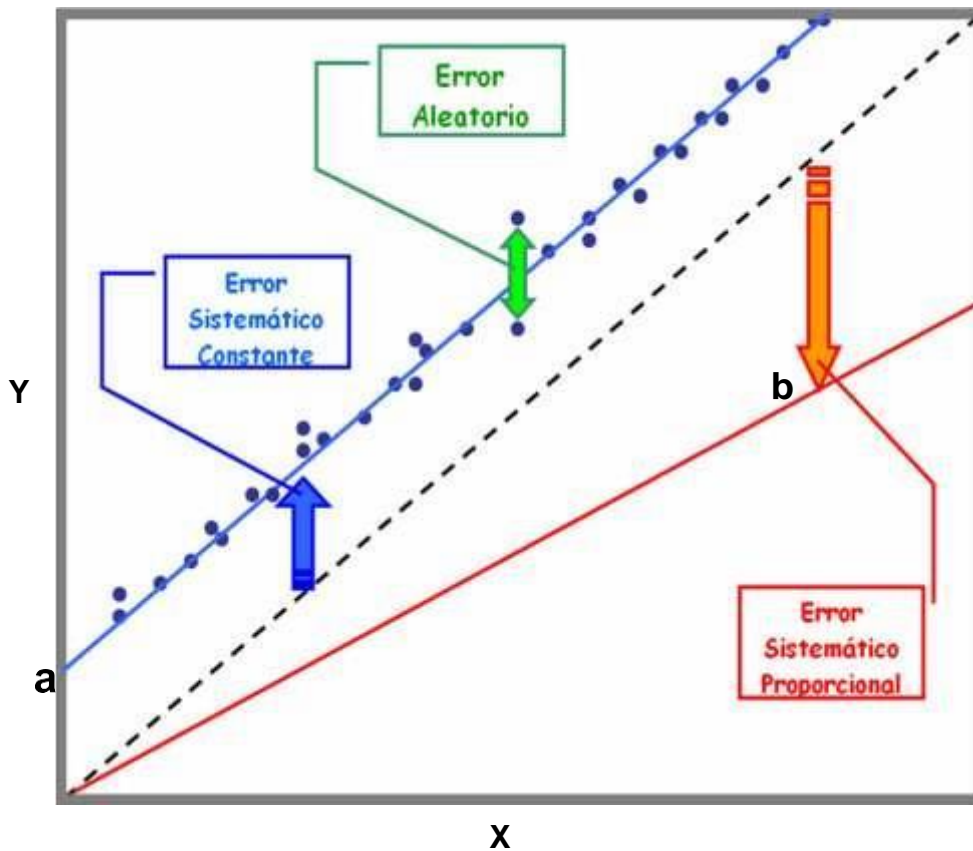
Las causas sistemáticas y proporcionales del error sistemático pueden ser evaluados a través de ensayos de comparación de métodos, donde el método en estudio es comparado con un método de referencia. De esta comparación surge una asociación lineal entre las medidas efectuadas por ambos métodos, lo cual a través de un análisis de regresión lineal se define con la ecuación de la recta $Y = a + bX$, donde Y representan los valores obtenidos con el método en estudio y X los valores obtenidos con el método de referencia. A partir de la ecuación de la recta se establece que el Error Sistemático Proporcional será definido a partir del valor de la pendiente (b) para los distintos Niveles de Decisión Médica (X_c) de la siguiente manera:

$$ESP = bX_c - X_c$$

Mientras tanto, el Error Sistemático Constante será definido a partir del valor de la ordenada al origen (a) de la siguiente manera:

$$ESC = a$$

Un representación esquemática del establecimiento de ESC y ESP establecido por comparación de métodos se muestra en la siguiente figura:



La magnitud del EST está representada por el Bias, quien en definitiva establece el valor de la veracidad de un método. Es importante recordar que el Bias de un método también puede ser obtenido por otros procedimientos entre los que se mencionan los ensayos de recuperación analítica, los ensayos de interferencia analítica, ensayos de comparación con materiales de referencia (ver experimentos de verificación de Trabajo Práctico N° 5 y Guía CLSI EP 15 A2) y también a través de los controles de calidad externos o comparaciones interlaboratorios.

Error Aleatorio

El error aleatorio (EA) puede ser definido en términos de la precisión intermedia (S_T) de la siguiente manera:

$$EA = kS_T,$$

donde k es el nivel de confianza deseado, tomando valores de 1,65; 1,96 ó 3,00 para el 90; 95 ó 99,7% de confianza, respectivamente.

Error Total

$$Error\ Total = |Error\ Sistemático\ Total| + Error\ Aleatorio$$

$$ET = |EST| + EA = |(bX_c - X_c) + a| + kS_T$$

Dónde X_c es el Nivel de Decisión Médica requerido, S_T la desviación estándar total (obtenida en el experimento de precisión, Día 1), k es el nivel de confianza deseado, tomando valores de 1,65; 1,96 ó 3,00 para el 90; 95 ó 99,7% de confianza, respectivamente.

Análisis comparativos del Error Total calculado.

La comparación del Error Total (ET) calculado con el Error Total permitido (ET_p), establecido por alguno de los diferentes criterios que establecen los Requerimientos de Calidad en Bioquímica Clínica, proporcionará una idea clara de la calidad del método en términos de parámetros analíticos de precisión y veracidad. De esta manera se concluye que si el ET calculado para los distintos niveles de decisión médica (X_c) supera el valor del ET_p el método en estudio no cumple con los requerimientos de calidad establecidos para medir un determinado analito. De hacerlo bajo esta condición de no aceptabilidad del ET_p , esta situación producirá resultados incorrectos desde el punto de vista de la interpretación clínica. Además, un ET calculado no aceptable imposibilita al laboratorio diseñar e implementar cualquier sistema de Control de Calidad (QC) estadístico. De esta manera, el laboratorio debería estudiar seriamente la idoneidad del sistema analítico utilizado y/o la viabilidad del objetivo seleccionado.

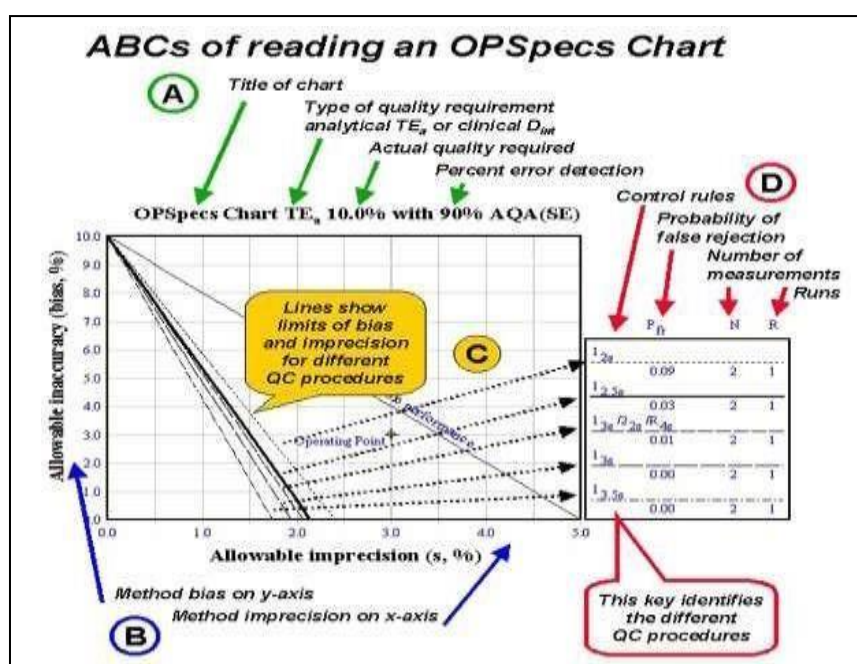
Control de calidad interno - Herramientas

Una vez que el laboratorio ha ACEPTADO el Error Total calculado (respecto a los requerimientos de calidad estipulados, por ej.: ET_p) a partir de los valores de imprecisión y bias obtenidos por la Evaluación de Métodos (Verificación/Validación), puede afirmar que el método es aceptable en términos analíticos. No obstante, el laboratorio debe asegurar en las distintas corridas analíticas que el método será "estable" analíticamente a lo largo del tiempo. Para asegurar esta estabilidad analítica en el tiempo el laboratorio debe diseñar y aplicar un Control de Calidad Interno tomando como base los valores de imprecisión y bias obtenidos por el método y los requerimientos de calidad especificados para el analito para los distintos niveles de decisión médica (X_c). Para este propósito, se han desarrollado diferentes herramientas para diseñar una estrategia de control de calidad interno, pero al presente sólo existe una única herramienta cuantitativa que evalúa estabilidad analítica y es la basada en el Control de Calidad Estadístico. La aplicación de las distintas reglas de control a partir de la medición de muestras controles en una corrida analítica van a determinar el nivel de chances o probabilidad de detectar la ocurrencia de un error que supera el inherente al método cuando este efectivamente ocurre. En resumen, dos tipos de probabilidades pueden ser identificadas al aplicar reglas controles en una corrida analítica, la probabilidad de detección de errores (P_{de}) y probabilidad de falso rechazo (P_{fr}). Estas probabilidades se obtienen a partir de la aplicación de gráficas de funciones de poder (Power Function Graph) que se generan para cada regla control y para distintas cantidades de controles (N) dentro de una corrida analítica (R). De estas gráficas de funciones de poder se dedujeron las P_{de} al 90 % (Alto poder de detección) y al 50% (Moderado poder de detección) para distintas cantidades de muestras controles ($N \geq 2$) y diferentes reglas controles. Estas deducciones pueden ser graficadas y se denominan Cartas/Diagramas de Especificaciones Operativas o *OPSpecs charts*.

Diagramas de especificaciones operativas u OPSpecs charts (Diagramas OPSpecs)

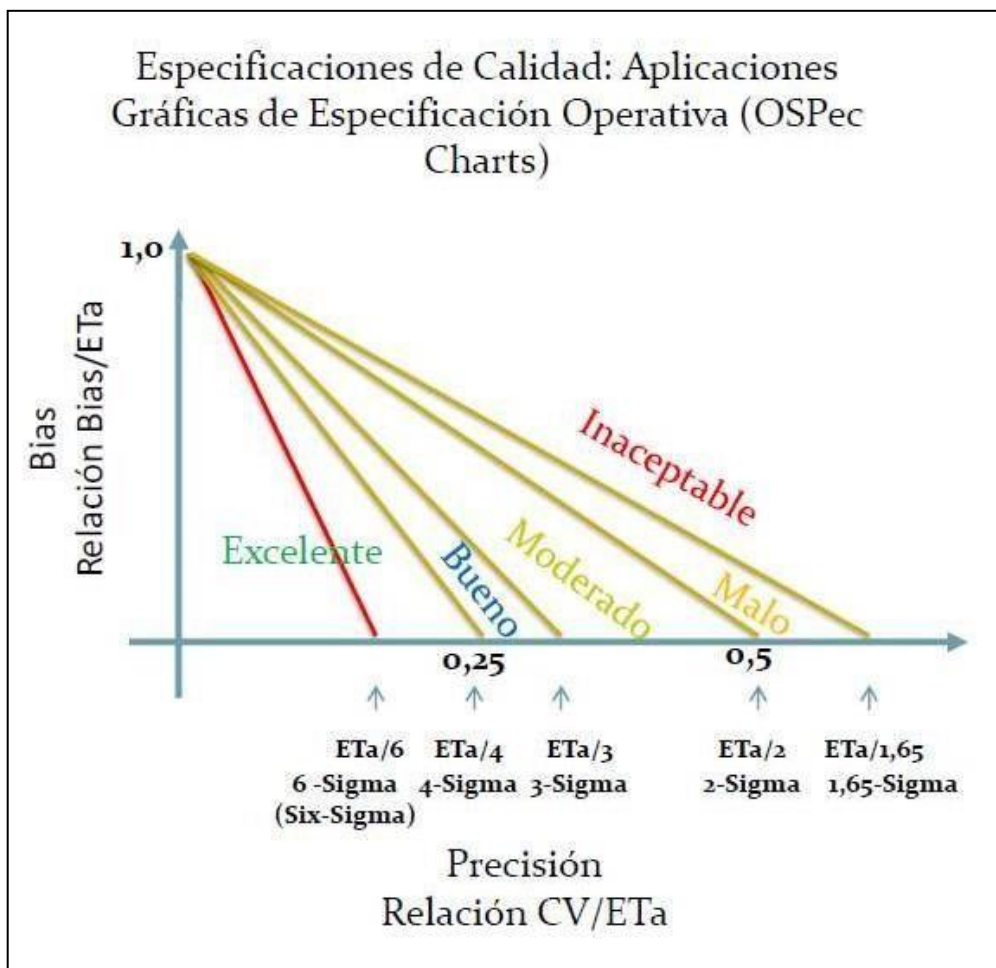
Una de las herramientas que permiten planificar y diseñar una estrategia de control de calidad interno son las denominadas OPSpecs Charts o Diagramas de Especificaciones Operativas. Estos diagramas se basan en la Probabilidad de detección de errores (Pde) y en la Probabilidad de falso rechazo (Pfr) que tienen las reglas controles en detectar la pérdida de estabilidad analítica de un método. Para los Diagramas OPSpecs se tienen en cuenta los requerimientos de calidad en términos del Error Total permitido (ETp), la imprecisión y veracidad obtenidos de la evaluación de métodos en términos de coeficiente de variación (%CV) y bias (%Bias), y el error sistemático crítico del método. Los Diagramas OPSpecs determinan el punto operativo (PO) del método en términos de %CV y %Bias y permite establecer la regla control que podrá ser utilizada con fines de controlar la “estabilidad analítica” del método con niveles de Pde al 90% (alta capacidad de detección de errores, HiPed), 50% (moderada capacidad de detección de errores, ModPed) o 25% (baja capacidad de detección de errores, LowPed) y bajo nivel de Pfr (preferentemente menor al 5%). Los Diagramas OPSpecs simulan ser “mapas” de planificación de la calidad exhibidos en un formato gráfico X vs Y donde se muestra la veracidad permitida (en el eje Y) y la imprecisión permisible (en el eje X) para diferentes procedimientos de control de calidad (reglas de control, número de muestras control) que proporcionan un nivel definido de la detección de error (el requisito de calidad, o de la garantía de calidad analítica).

La analogía del diagrama OPSpecs a un mapa ayuda a describir su uso. Para seleccionar un procedimiento de control de calidad apropiado, se debe ubicar en este mapa las coordenadas “x”, “y” correspondientes a la imprecisión y veracidad observadas en el método, ambas obtenidas en los experimentos de evaluación de métodos (validación/verificación). Estas coordenadas definen el PO del método. El objetivo es que el PO esté situado en una posición en la cual exista al menos una regla control que pueda “controlar” la “estabilidad analítica” del método para un determinado número de muestras controles (N) dentro de una corrida analítica (R). El siguiente esquema muestra un Diagrama OPSpecs indicando sus distintos componentes que ayudan a la interpretación y uso de esta herramienta estadística para control de calidad interno.



Otros usos de los Diagramas OPSpecs

A través de los Diagramas OPSpecs con un 90% Pde se puede establecer la calidad o performance de un método en términos de sus parámetros analíticos: imprecisión y bias. Cada regla control (para cada N establecido) define en el Diagrama OPSpecs (con el 90% de Pde) una recta con pendiente negativa cuyo valor “b” representa el nivel del Error Sistemático Crítico. Por lo tanto, cuanto mayor es la pendiente (por ende el error crítico) más seguro resultará el método de medición. De esta manera, el Punto Operativo PO trazado en un Diagrama OPSpecs (Pde 90%) permitiría clasificar la performance de los métodos. De la siguiente gráfica se deducen las siguientes posibilidades:



Situación Inaceptable: El método tiene “*pobre (poor) performance*” cuando está en la región de 1,65 sigma o menor, por lo que no es satisfactorio. Es el peor de los casos. En este caso es necesario substituir este método por otro de mejor performance para alcanzar el funcionamiento analítico necesario.

Situación Malo: El método tiene una “*performance marginal*” cuando está en la región 1,65 sigma y 2 sigma. En este caso es necesario introducir acciones de mejoras en la performance del método para poder utilizarlo.

Situación Moderado: El método tiene una *moderada performance* cuando está entre la región 2 sigma y 3 sigma. Si bien se logra la calidad necesaria y el proceso está trabajando correctamente, podría ser considerado un método de alto riesgo y poco productivo dado que para la operación de rutina requiere utilizar entre 4 y 8 muestras controles por corrida, operadores bien entrenados,

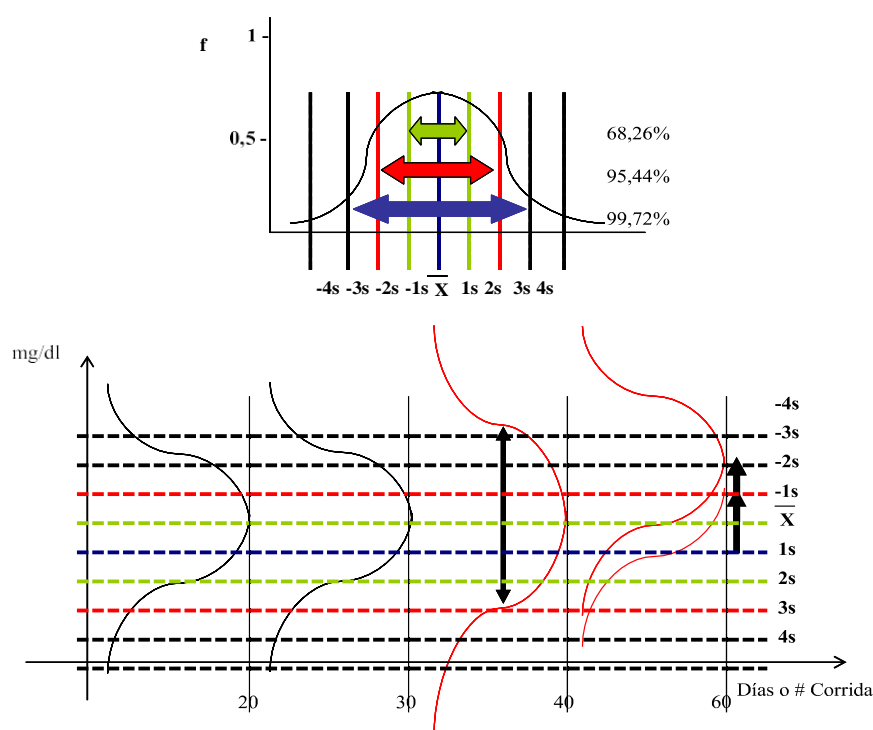
poca rotación del personal, un mantenimiento preventivo riguroso, un control de calidad adicional al estadístico y un esfuerzo continuo para mejorar la performance del método.

Situación Bueno: El método tiene “*buenapformance*” cuando está en la región de 3 sigma y 4 sigma. Se consiguen aceptar los requerimientos de calidad, y la estabilidad del método puede ser controlada con la utilización de 2 a 4 muestras controles por corrida usando procedimientos multi-reglas o reglas simples como la 2,5s.

Situación Excelente: El método tiene una “*excelente performance*” cuando está en una región 4 sigma o superior. La máxima calidad y mayor seguridad analítica se logra en la región 6 sigma (six-sigma) o superior. Estos métodos cuando alcanzan este nivel de calidad pueden ser fácilmente controlados con sólo 2 controles por corrida y una regla control simple como la 1-2,5s o 1-3,0s.

Control de calidad interno - Diseño

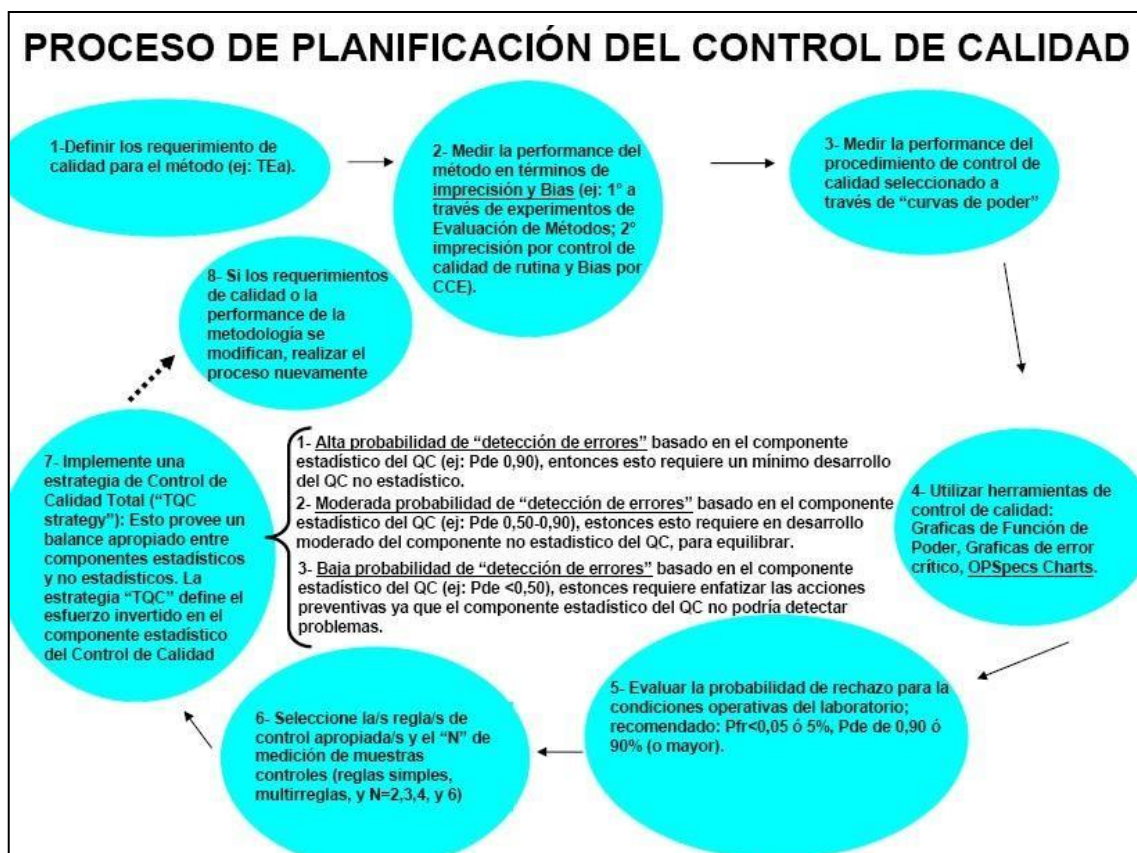
Una vez que el método es aceptable, en términos de precisión (desviación estándar, s) y veracidad (Bias), en comparación a lo establecido por los Requerimientos de Calidad, es fundamental demostrar que esta calidad analítica se mantiene “estable” en el tiempo en término de precisión y veracidad. Es decir, el método se ejecuta rutinariamente de manera “analítica estable”. En términos estadísticos, la estabilidad de un método se traduce en el mantenimiento de la campana de Gauss en el tiempo tal como lo establece la siguiente figura:



De la figura también se deduce que la pérdida de estabilidad analítica, ya sea por causa aleatoria o sistemática, se traducirá en una modificación de la campana de Gauss. Este comportamiento gausseano de la estabilidad analítica de un método constituye la base del CONTROL DE CALIDAD INTERNO a partir de la construcción de las Cartas de Control o Levey-Jenning. De este comportamiento estadístico y del nivel de distribución central de los datos se establecen las reglas controles que permiten establecer, con una determinada probabilidad asociada, la ocurrencia de errores no permitidos durante la ejecución rutinaria de un método.

Es importante destacar, que los valores de imprecisión (en término de s) obtenidos por el laboratorio bioquímico en la Evaluación de Métodos serán los utilizados como límites de seguridad en las cartas de Control de Calidad Interno.

Ahora bien...¿Qué etapas debemos tener en cuenta para el diseño de un Control de Calidad Interno? Estas etapas deben estar definidas para comenzar un proceso objetivo de planificación de la calidad, según lo indicado en el siguiente esquema:



- Definir los requerimientos de calidad;
- Determinar la performance del método en términos de imprecisión e inexactitud;
- Identificar estrategias estadísticas de control de calidad;
- Predecir la performance del control de calidad;
- Seleccionar las reglas de control y el número de mediciones de los control(es);
- Seleccionar el control de calidad apropiado.

EJERCICIOS PRÁCTICOS

1) Un laboratorio de análisis clínicos validó la precisión y veracidad de un método para medir albúmina en suero, siguiendo las normativas estipuladas en las guías EP5-A2 y EP9-A2 de la CLSI

a) Completar la siguiente tabla calculando el error total del método ($k=2$) a los niveles de decisión médica (NDM) de albúmina.

NDM (g/dL)	S (g/dL)	CV (%)	Bias (g/dL)	Bias (%)	Error Total (g/dL)	Error Total (%)
2		1,14	0,03			
3,5		1,39	-0,015			
5		1,81	-0,06			

b) Compare con las especificaciones de calidad propuestas por CLIA'88, EQAs y Variabilidad Biológica deseable (VBd), concluyendo sobre el desempeño del método.

NDM (g/dL)	Error método Total (%)	Error Total Permitido (CLIA'88)	Error Total Permitido (EQAs)	Error Total Permitido (VBd)
2				
3,5				
5				

2) Un laboratorio de análisis clínicos, al validar la precisión de un método de medición de bilirrubina total en suero siguiendo las normativas estipuladas en las guías EP5-A2, obtuvo los siguientes valores de precisión intermedia:

Media (mg/dL)	St (mg/dL)
1,35	0,22
17,81	1,63

El *bias* del método estimado por un experimento de comparación de métodos siguiendo las normativas estipuladas en la guía EP9-A2 de la CLSI fue de 3,6% y 4,5% para los niveles de decisión médica (NDM) de bilirrubina total de 1,4 y 20 mg/dL, respectivamente.

- a) Estime el Error total del método para los mencionados NDM de bilirrubina total ($k=2$). Compare con las especificaciones de calidad de CLIA'88 y EQAs de la siguiente tabla.

NDM (mg/dL)	Error Total método (mg/dL)	Error Total método (%)	Error Total Permitido (CLIA'88) (mg/dL)	Error Total Permitido (EQAs) (mg/dL)
1,4			0,4	0,4
20			4	5,7

- b) Compare los valores de error total obtenidos con las especificaciones de calidad de variabilidad biológica a los niveles mínimo (VBm), deseable (VBd) y óptimo (VBo) y concluya sobre el desempeño del método.

NDM (mg/dL)	Error Total método (%)	Error Total Permitido (VBm) (%)	Error Total Permitido (VBd) (%)	Error Total Permitido (VBo) (%)
1,4				
20				

Datos:

CV bilirrubina total: 23,8%

CVg bilirrubina total: 39,0 %

$ETa (VBm) < 1,65 (0,75 CVi) + 0,375 (CV^2I + CV^2G)^{1/2}$

$ETa (VBd) < 1,65 (0,50 CVi) + 0,250 (CV^2I + CV^2G)^{1/2}$

$ETa (VBo) < 1,65 (0,25 CVi) + 0,125 (CV^2I + CV^2G)^{1/2}$

3) Un laboratorio de análisis clínicos, en la etapa de Evaluación de Métodos para medir colesterol sérico obtuvo los siguientes resultados: Bias: 0% y $s: 2,7 \text{ mg/dL}$ o 1,35% para un nivel de decisión médica (NDM) de 200 mg/dL. Dos muestras control ($N=2$) fueron utilizadas. El ETp es de 20 mg/L, lo cual para un NDM de 200 mg/dL el ETp porcentual será del 10%.

- a- Grafique el punto operativo en una Carta de Especificación Operativa Normalizada (OPS Specs Chart) con un 90% de Pde.
- b- Señale que regla o reglas puede ser utilizadas justificando su respuesta.

4) El mismo laboratorio, en la etapa de Evaluación de Métodos para medir cloruros ha obtenido un *bias* de 0% y un $s: 1,04 \text{ mmol/L}$ o CV: 1,04% para un nivel de decisión médica (NDM) de 100 mmol/L. Dos muestras control ($N=2$) han sido utilizadas. El ETp es de 4,0 mmol/L, lo cual corresponde el 4% para un NDM de 100 mmol/L.

- a- Grafique el punto operativo en una OPS Specs Chart Normalizada con un 90% de Pde.
- b- Señale si hay alguna regla control que puede ser utilizada justificando su respuesta.
- c- Si en vez de utilizar una OPS Specs Chart Normalizada con un 90% de Pde ahora usamos una con un 50% de Pde ¿cuántas reglas de control podemos utilizar? Señale ventajas y/o desventajas.
- d- Analice OPS Specs Chart Normalizadas conteniendo $N>2$. Establezca conclusiones sobre ventajas en cuanto al costo/beneficio sobre el uso de este método para medir cloruros.

5) En los ensayos realizados en la etapa de Evaluación de métodos para la determinación de Eritrocitos se obtuvieron los siguientes parámetros:

CV= 1,05% (evaluado a dos niveles de concentración); Bias=1,5%.

En base a esos resultados, y contemplando los requerimientos establecidos en base a la variabilidad biológica en condiciones "deseables", desarrolle los siguientes puntos:

- a) Grafique el "Punto Operativo" de este método en una OPSpecs Chart para un 90% de Pde (Probabilidad de detección de errores, *HiPde*), y contemplando la utilización de 3 ó 6 muestras control (N=3 ó N=6). Si es necesario grafique el "Punto Operativo" de este método en una OPSpecs Chart para un 50% de Pde (*MoPde*); JSR.
- b) Determine en la gráfica utilizada que regla/s control/es puede/n ser utilizada/s para controlar esta metodología. En caso de ser más de una, elija una y JSR.

Anexo I

I) Un laboratorio, para medir pCO_2 en sangre arterial, en la etapa de Evaluación de Métodos obtuvo los siguientes parámetros, un *bias* 0,2 mm de Hg y un CV de 2,5% para un nivel de decisión médica (NDM) de 40 mm de Hg. El ETp es de 12,5% para un NDM de 40 mm de Hg.

- a- Grafique el punto operativo en OPSpecs Chart Normalizadas con diferentes niveles de N y con 90% y 50% de Pde.
- b- Señale que regla o reglas puede ser utilizadas justificando su respuesta (aquí tenga en cuenta el costo/beneficio de utilizar tal o cual estrategia de control).

II) En un laboratorio de hematología, en los ensayos realizados en la etapa de Evaluación de Métodos para la medición de Leucocitos se obtuvieron los siguientes parámetros: CV= 3,5% (evaluado a dos niveles de concentración) y un Bias=1,5%.

En base a esos resultados, y contemplando los requerimientos establecidos por CLIA, desarrolle los siguientes puntos:

- a- Grafique el “Punto Operativo” de este método en OPSpecs Chart Normalizadas para un 90% y 50% de Pde con diferentes niveles de N.
- b- Señale que regla o reglas puede ser utilizadas justificando su respuesta. (aquí tenga en cuenta el costo/beneficio de utilizar tal o cual estrategia de control).

III) El mismo laboratorio, interesado en la determinación de gases en sangre, en la etapa de Evaluación de Métodos para la determinación de pO_2 , haobtenido un CV de 4,1% y un bias entre métodos cercano a cero. El ETp según CLIA es de 16,5% calculado de resultados de *Proficiency testing* (PT) donde el CV% grupal fue de 5,5% en 4 diferentes PT.

- a- Grafique el punto operativo en una OPSpecs Chart con con diferentes niveles de N y con 90% y 50% de Pde.
- b- Señale que regla o reglas puede ser utilizadas justificando su respuesta. (aquí tenga en cuenta el costo/beneficio de utilizar tal o cual estrategia de control).

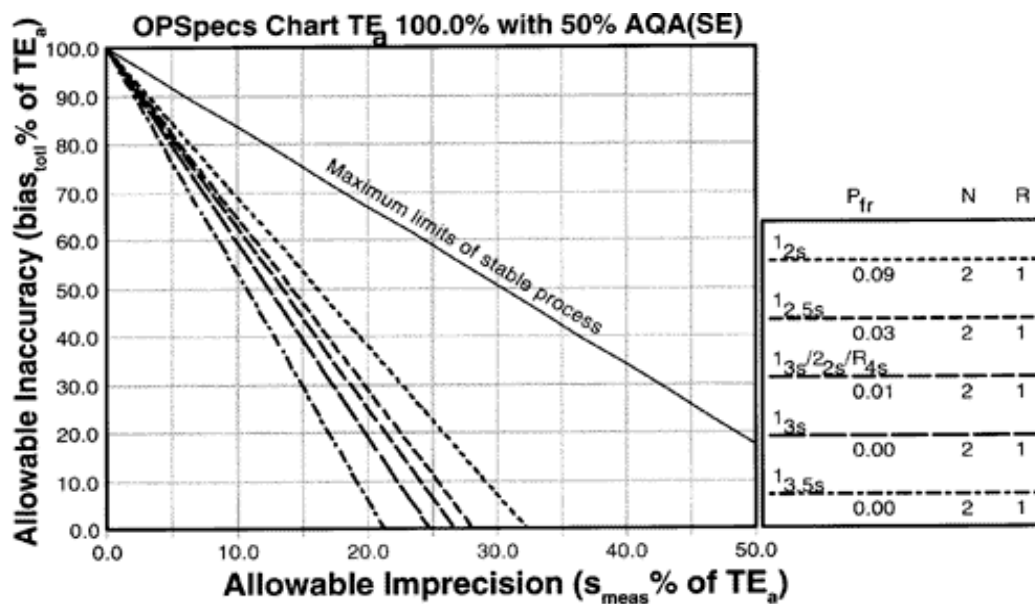
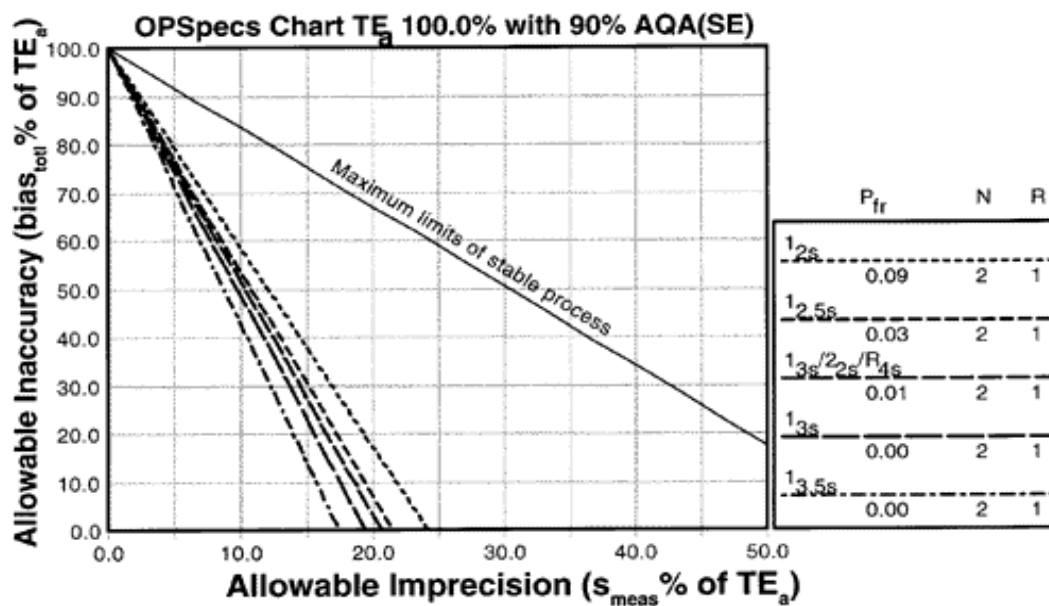
IV) Un analito clave en laboratorios que investigan osteoporosis es el calcio. En este sentido en la etapa de Evaluación de Métodos se haobtenido un s_d de 0,168 mg/dL a un NDM de 10,0 mg/dL. El ETp según CLIA es de 0,5 mg/dL.

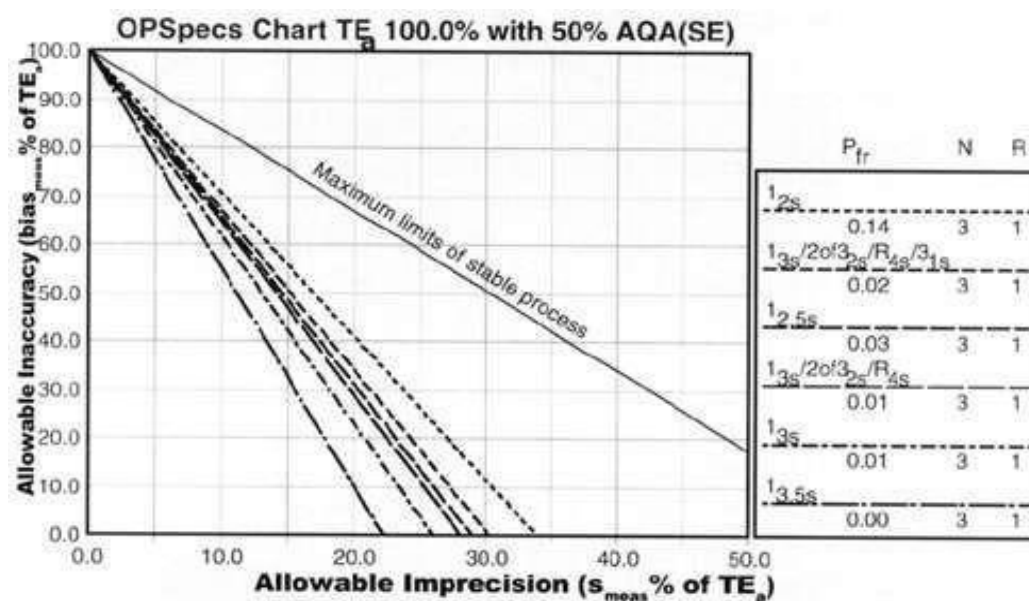
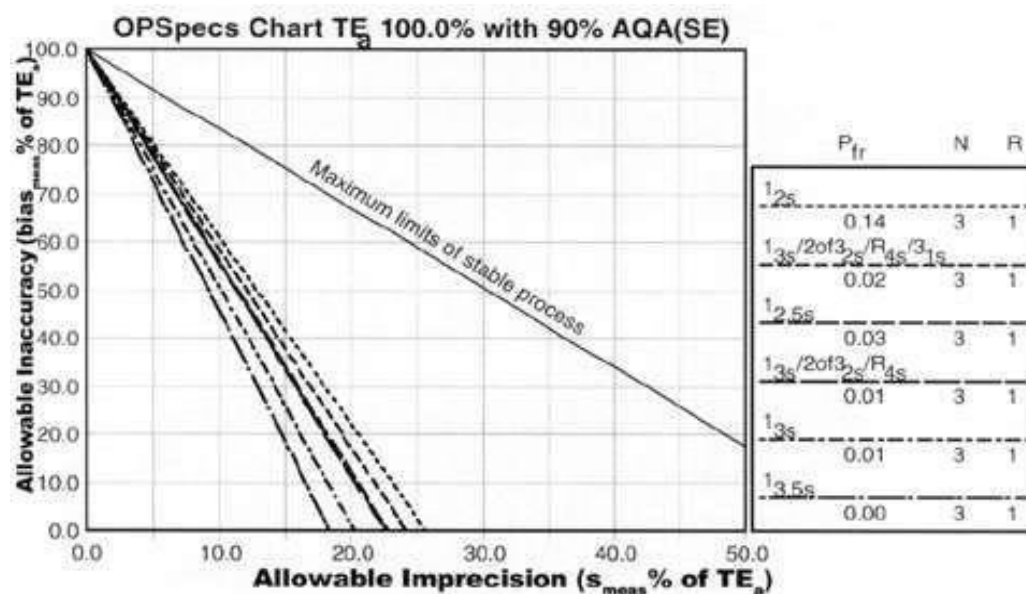
- a. Grafique el punto operativo en una OPSpecs Chart con con diferentes niveles de N y con 90% y 50% de Pde.
- b. Señale que regla o reglas puede ser utilizadas justificando su respuesta. (aquí tenga en cuenta el costo/beneficio de utilizar tal o cual estrategia de control).

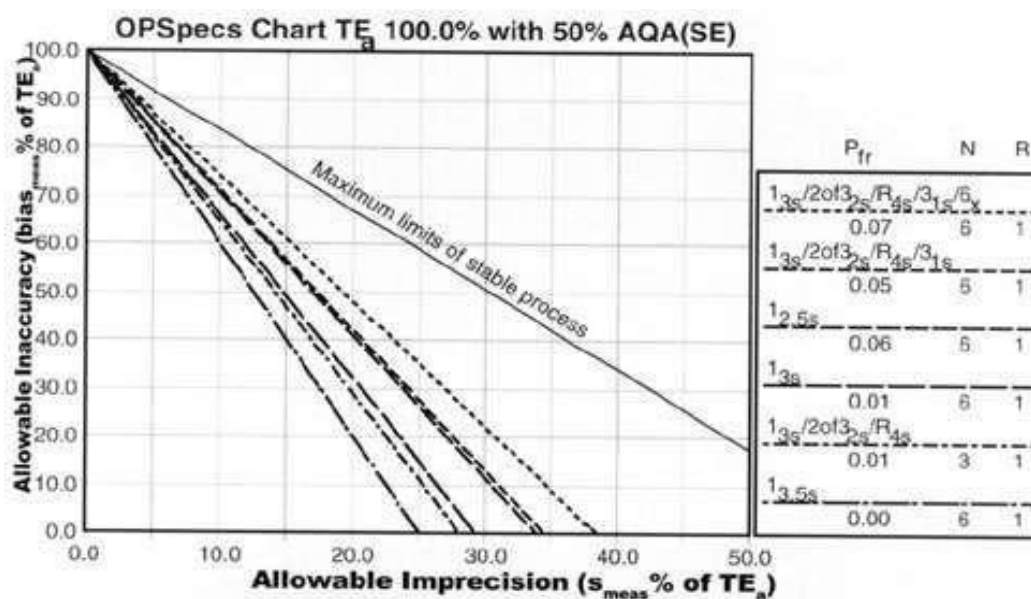
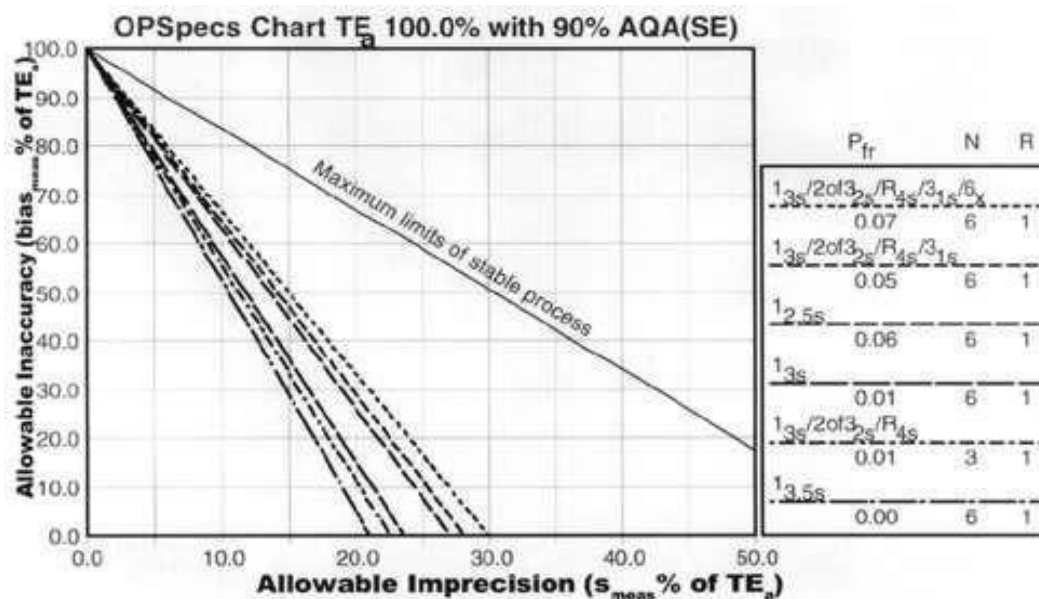
V) Un laboratorio, interesado en la medición de hormonas en sangre, en la etapa de Evaluación de Métodos para la medición de Tiroxina, ha obtenido un CV de 5,5% y un bias de cero a un NDM de 50 $\mu g/dL$. El ETp según CLIA es de 20%.

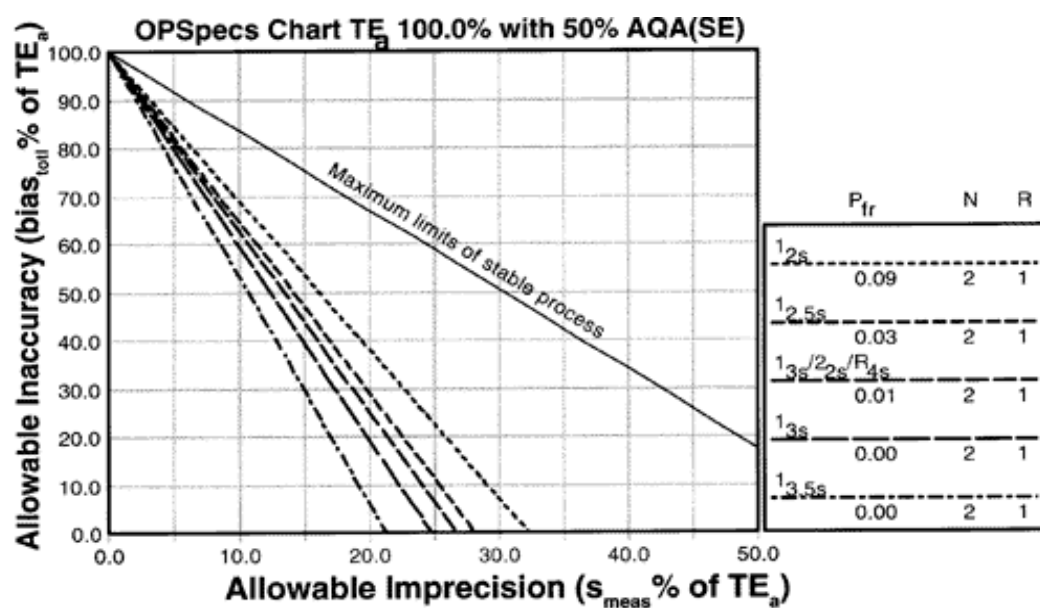
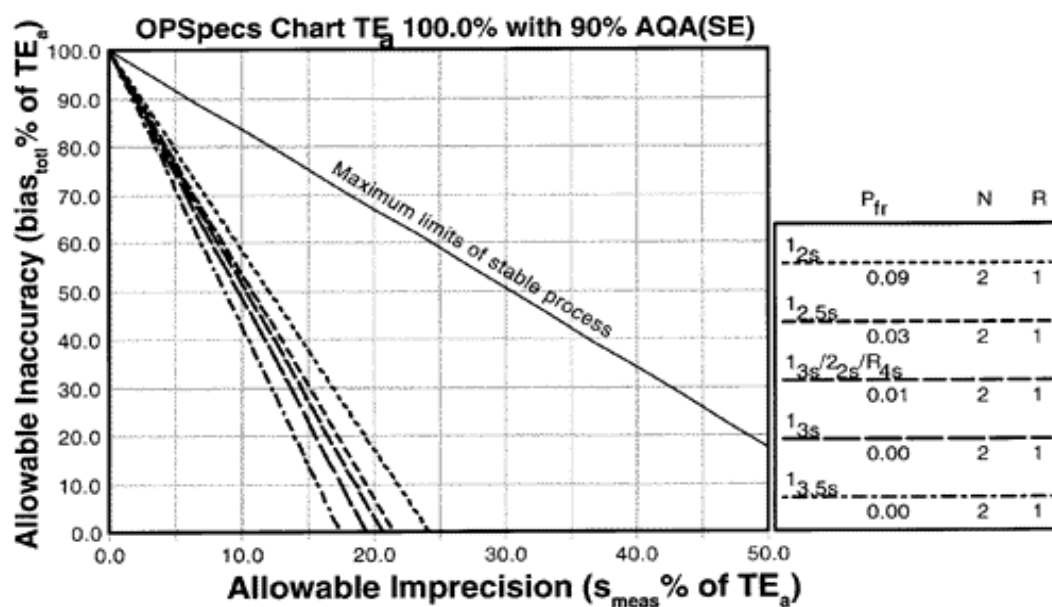
- a- Grafique el punto operativo en una OPSpecs Chart con con diferentes niveles de N y con 90% y 50% de Pde.
- b- Señale que regla o reglas puede ser utilizadas justificando su respuesta. (aquí tenga en cuenta el costo/beneficio de utilizar tal o cual estrategia de control).

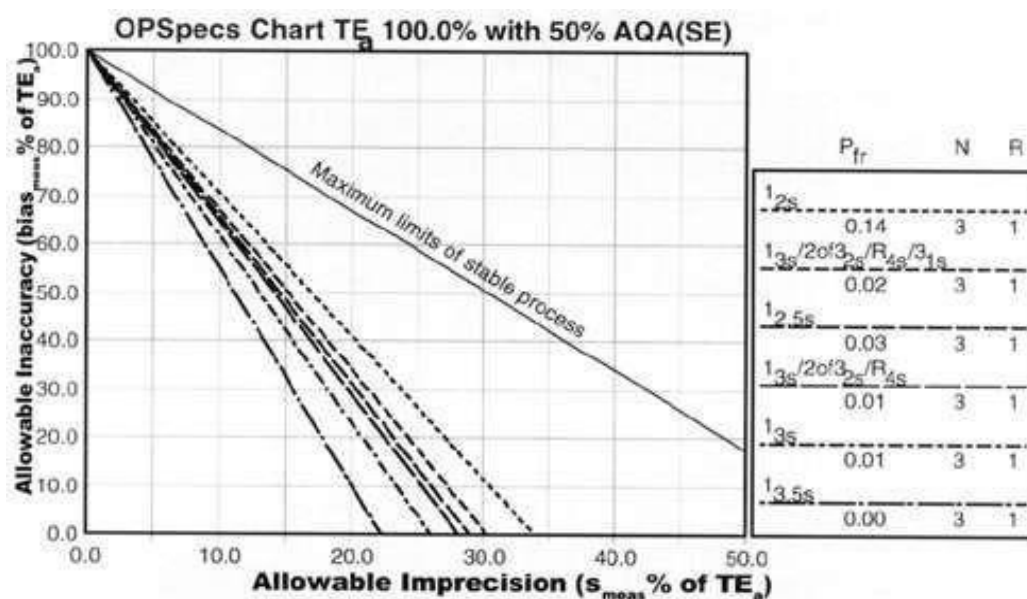
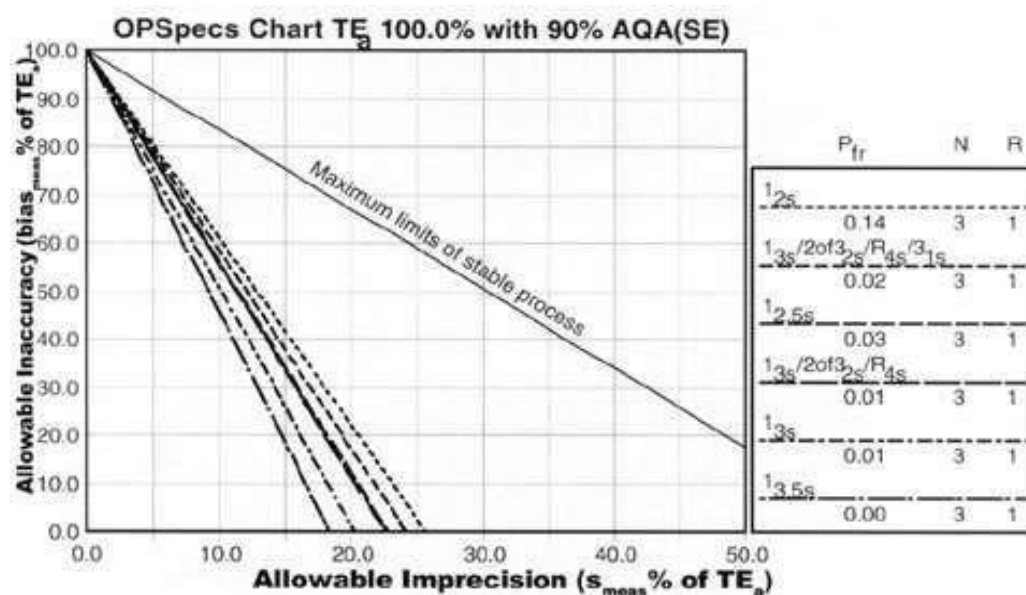
Anexo II

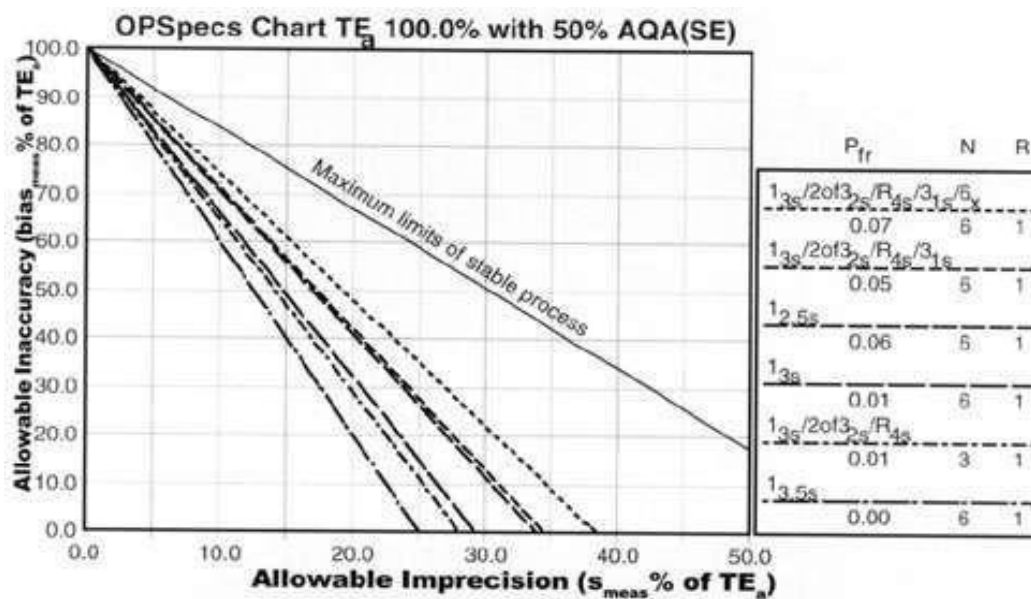
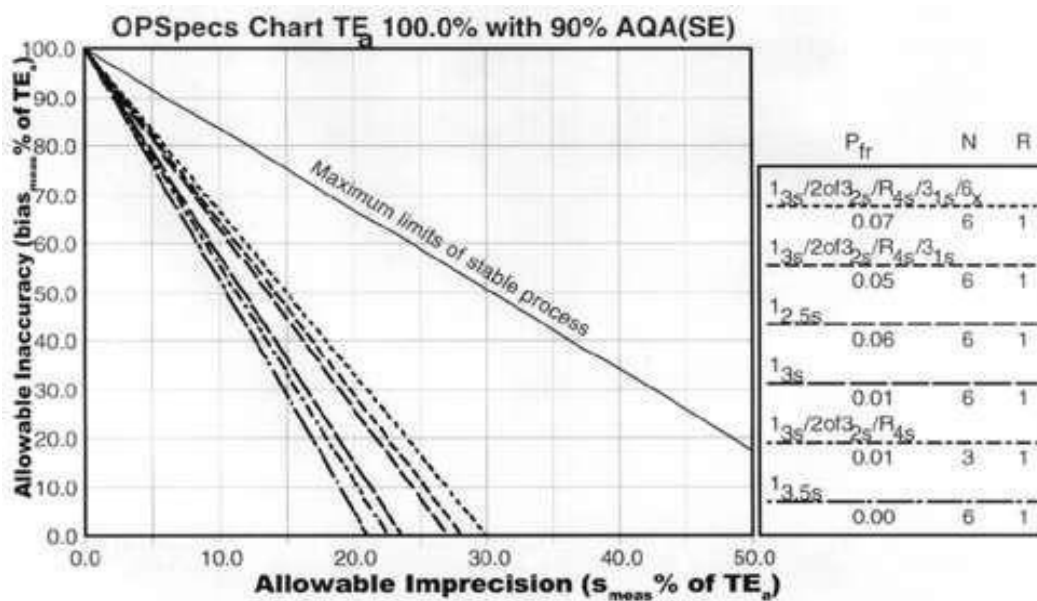


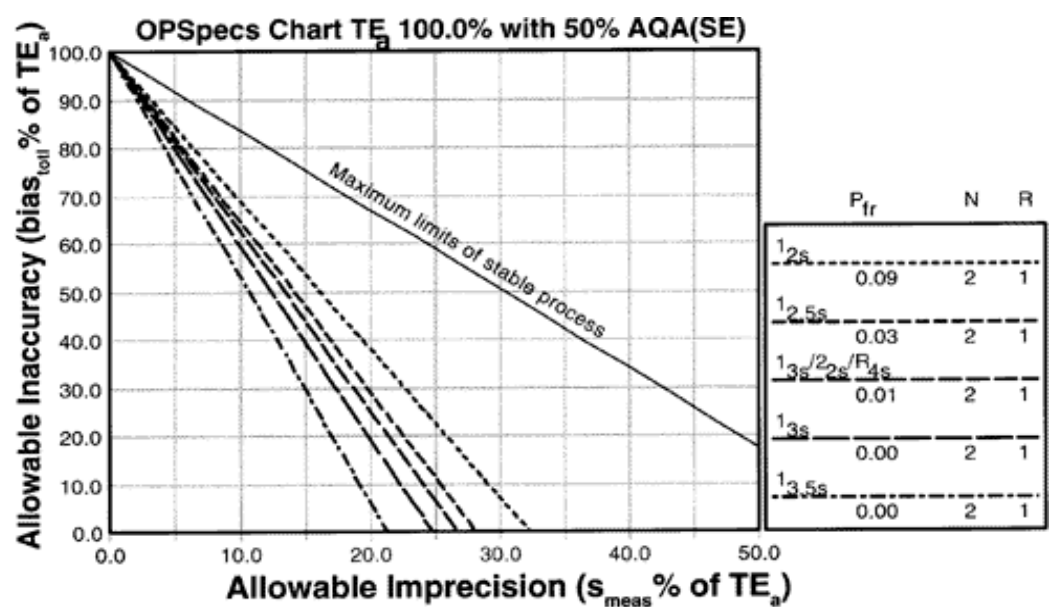
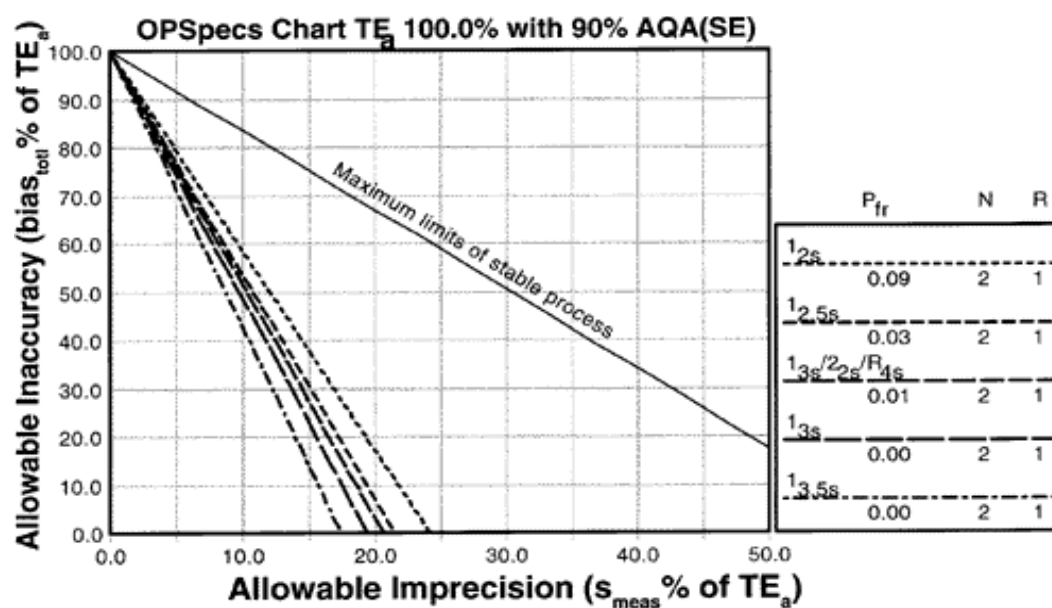


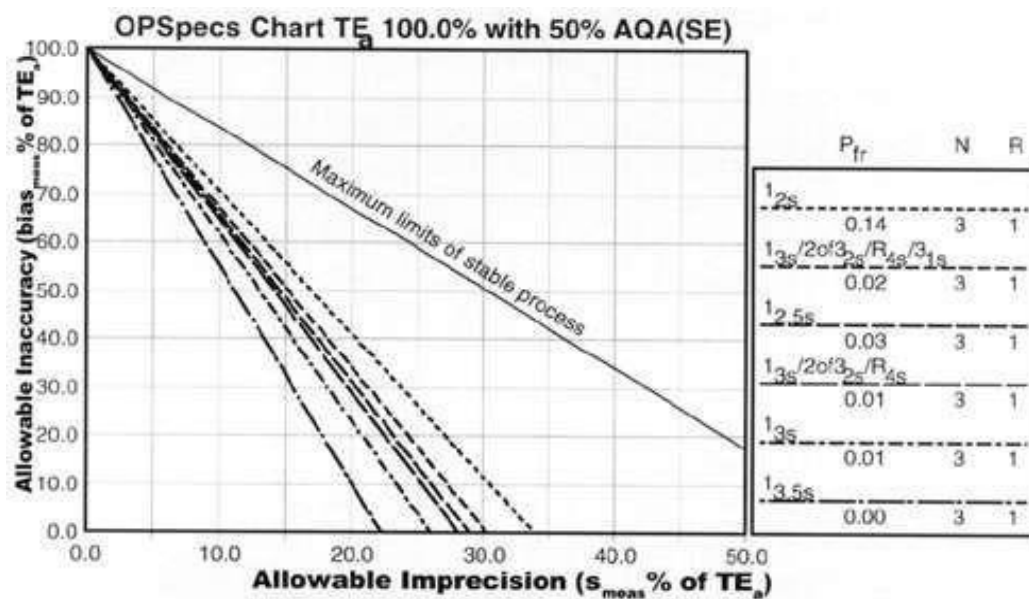
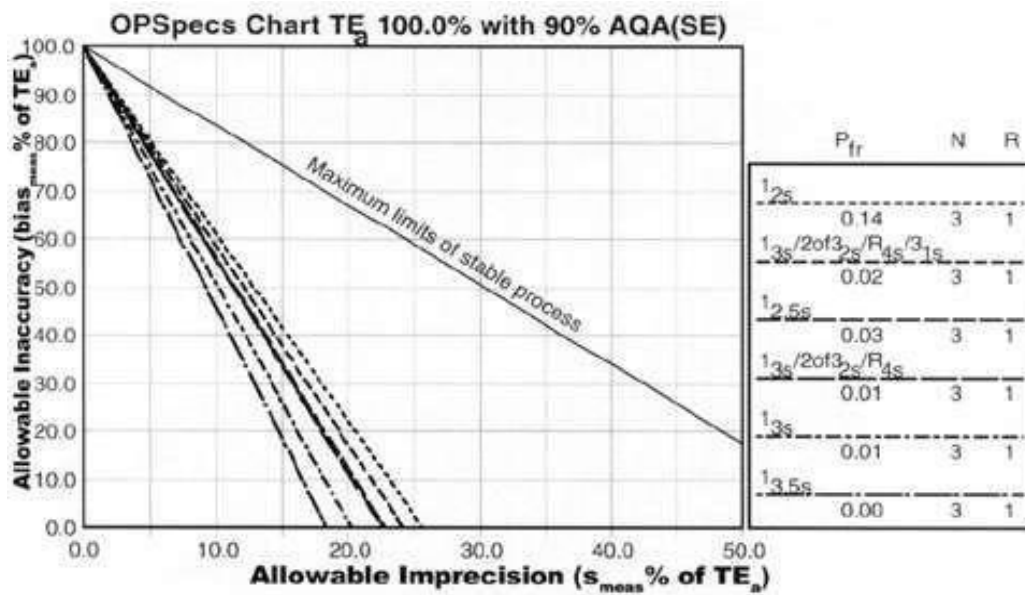


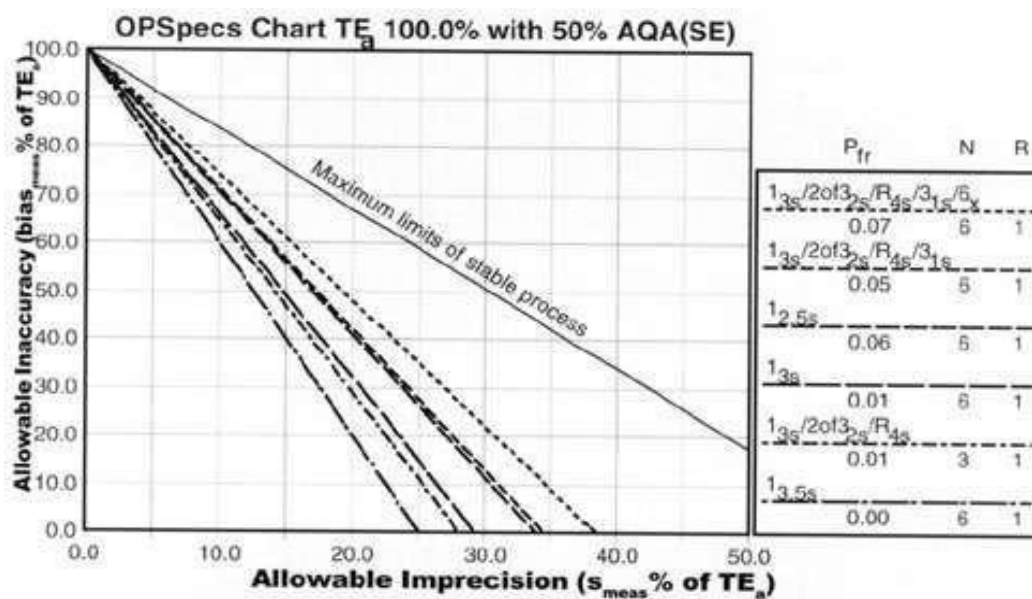
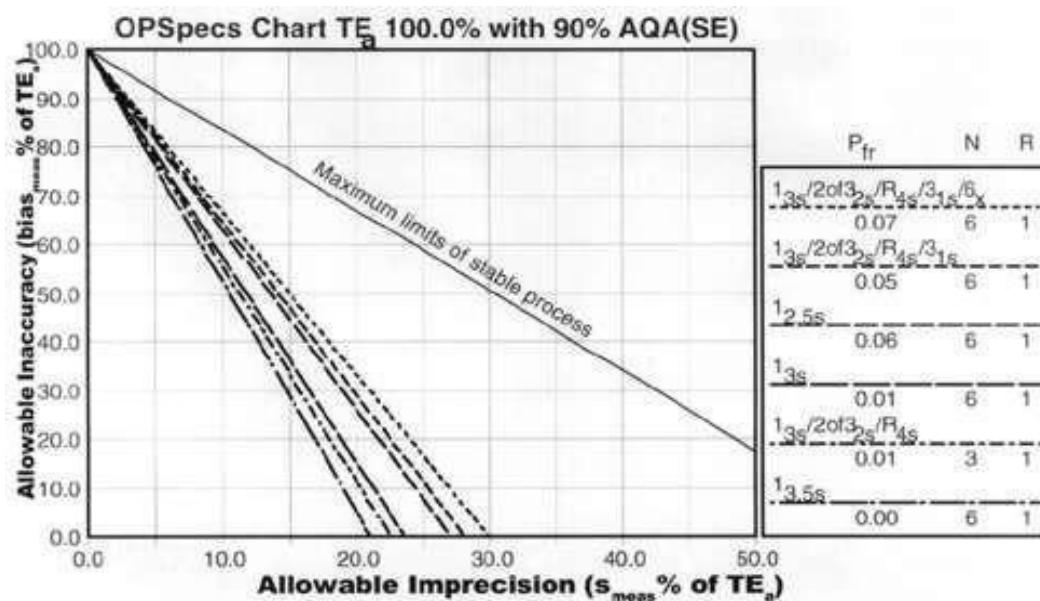


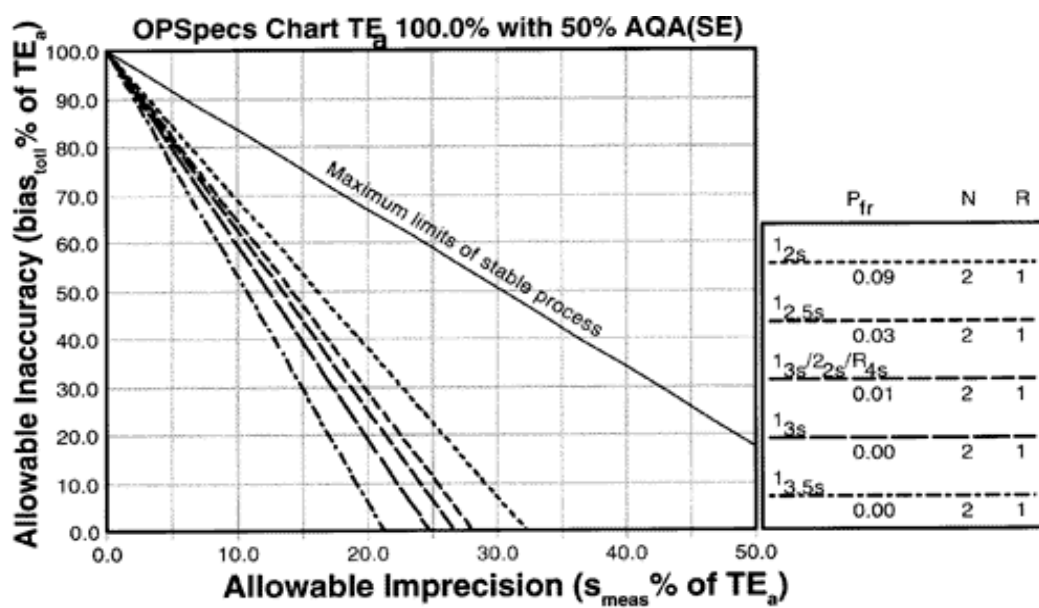
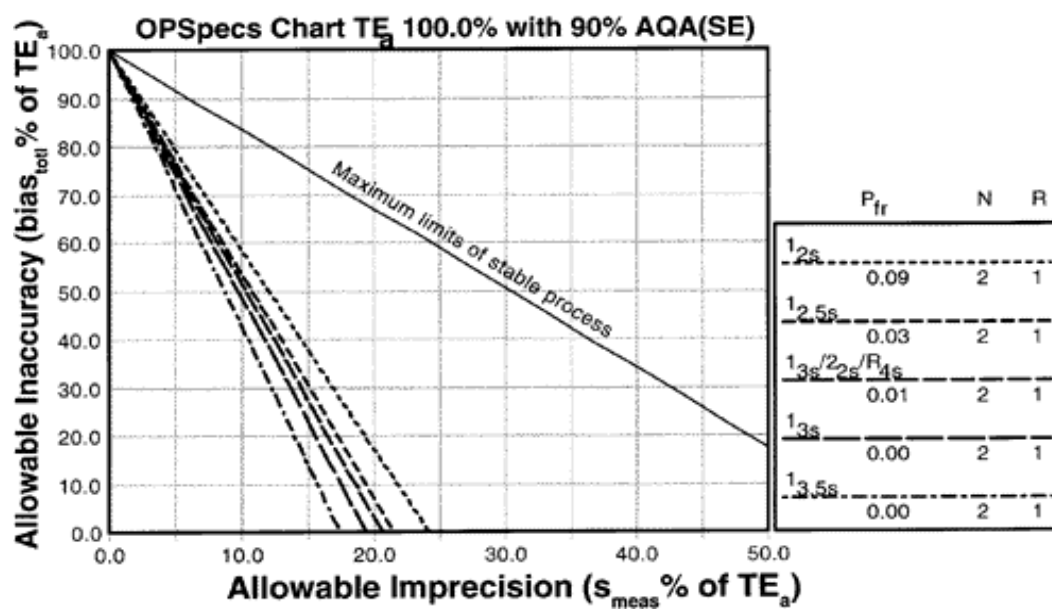


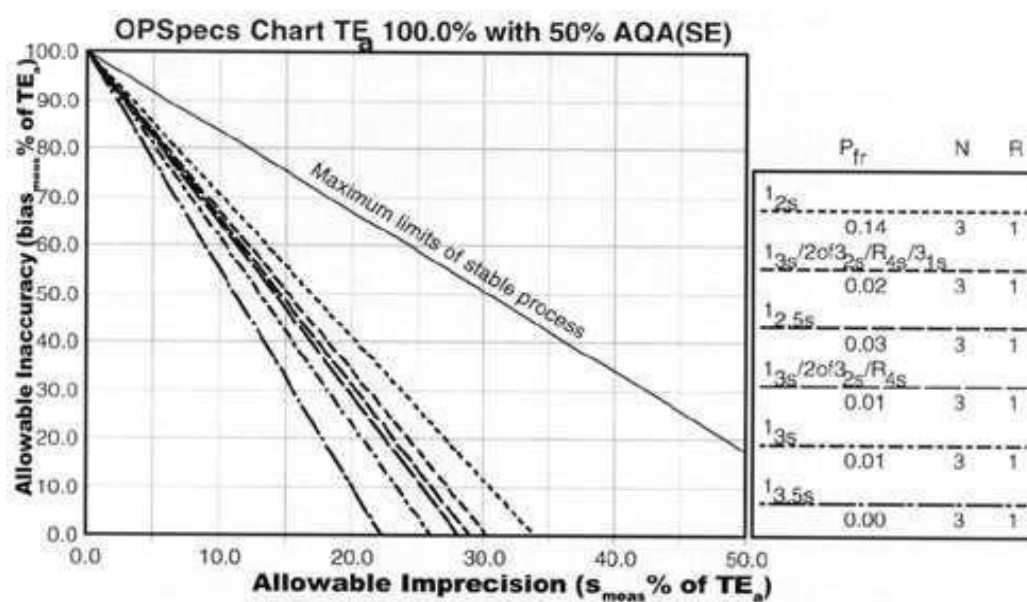
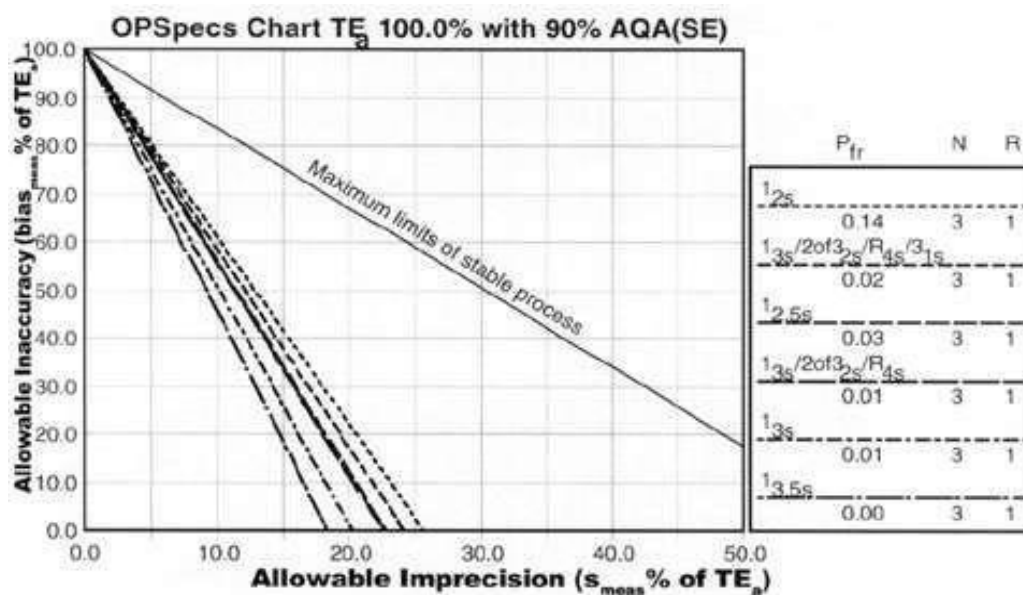


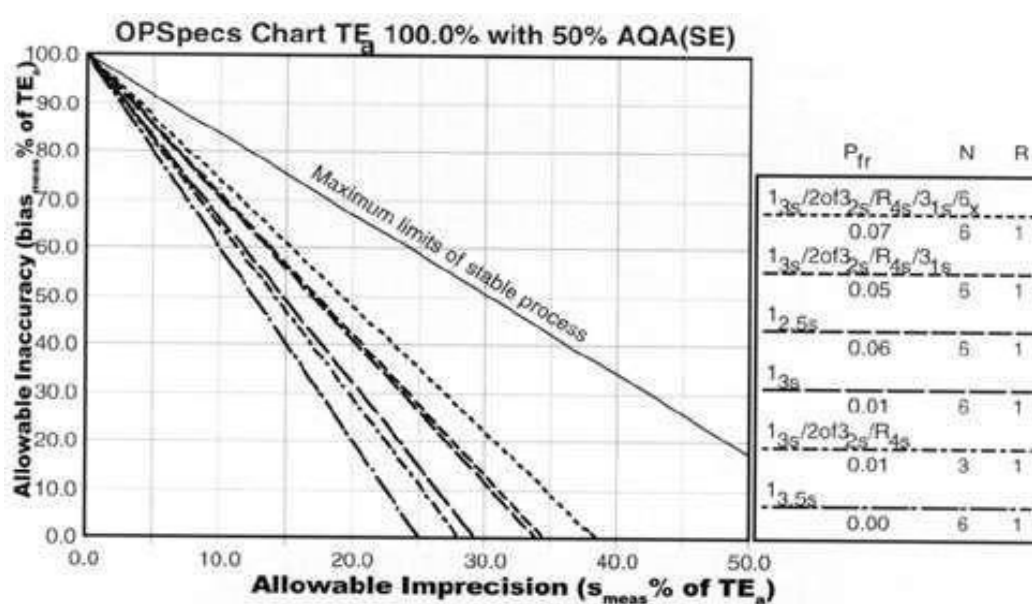
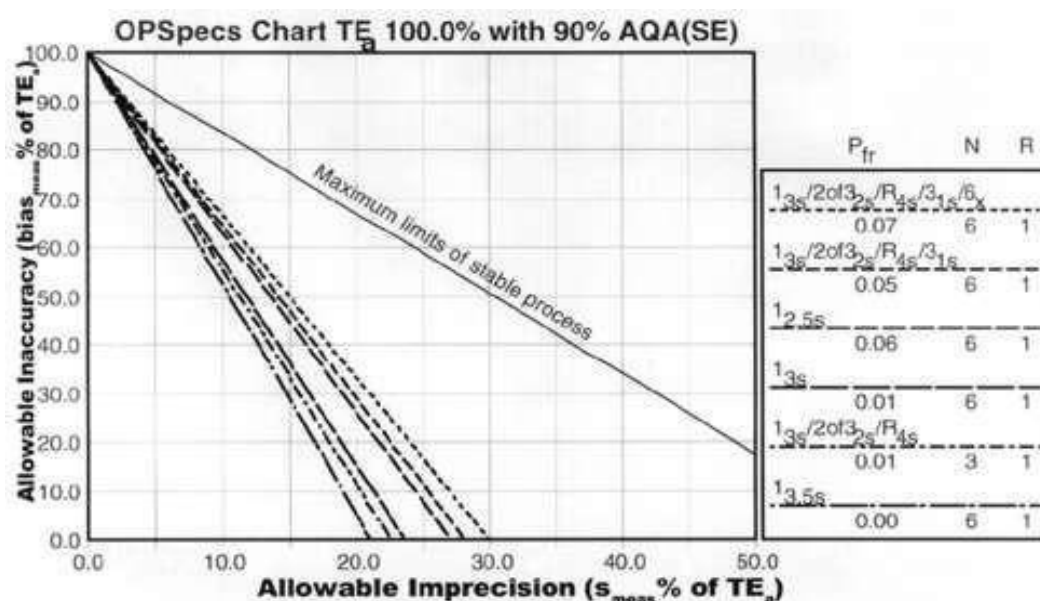


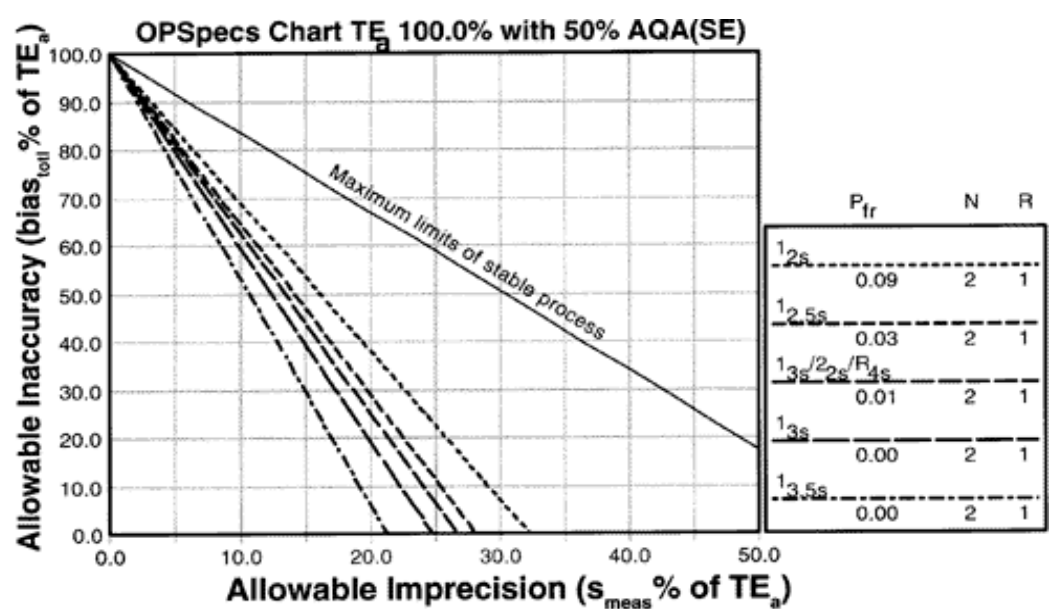
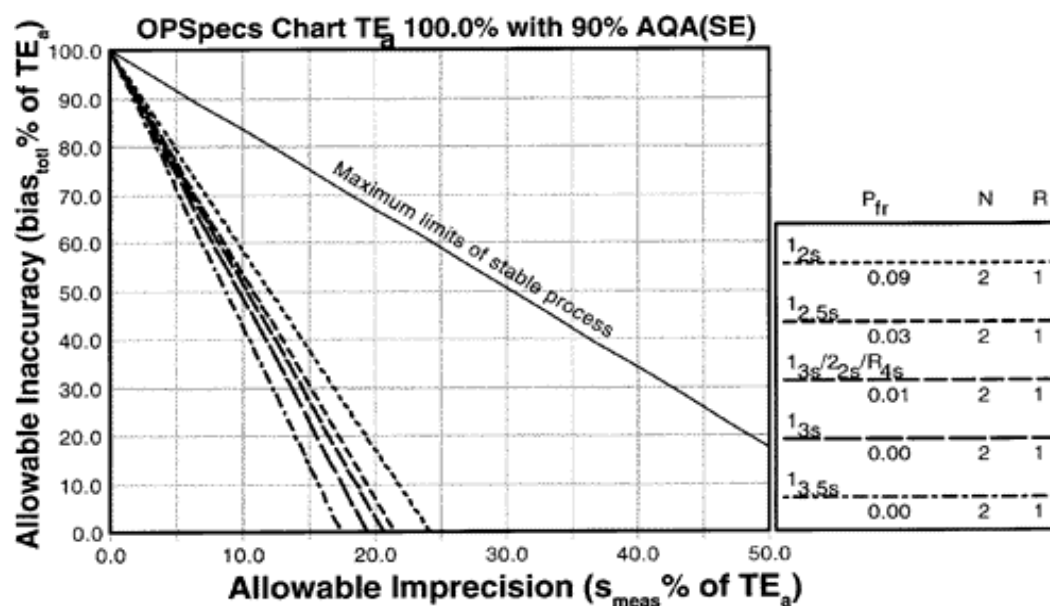


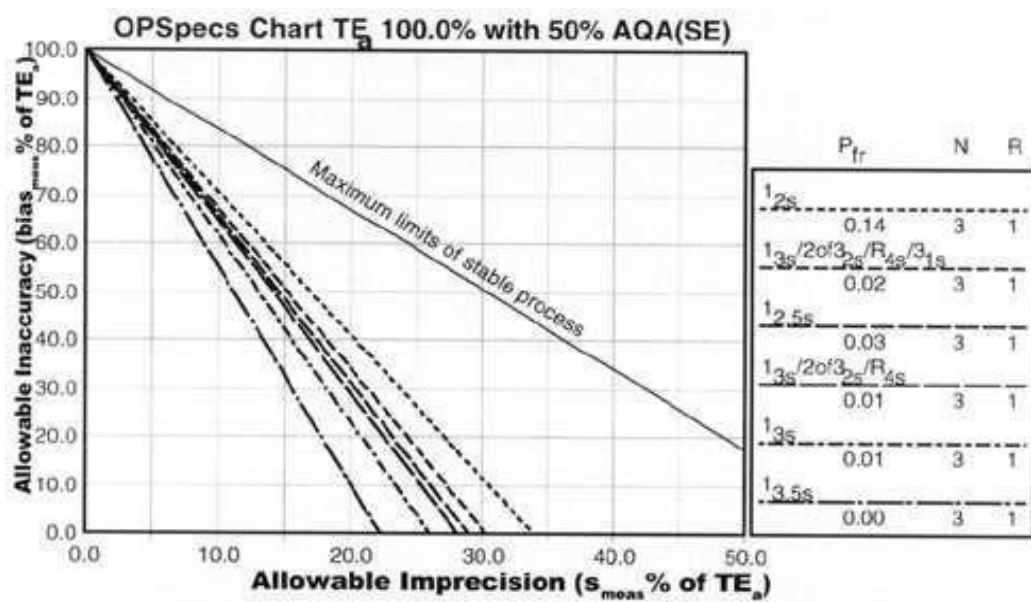
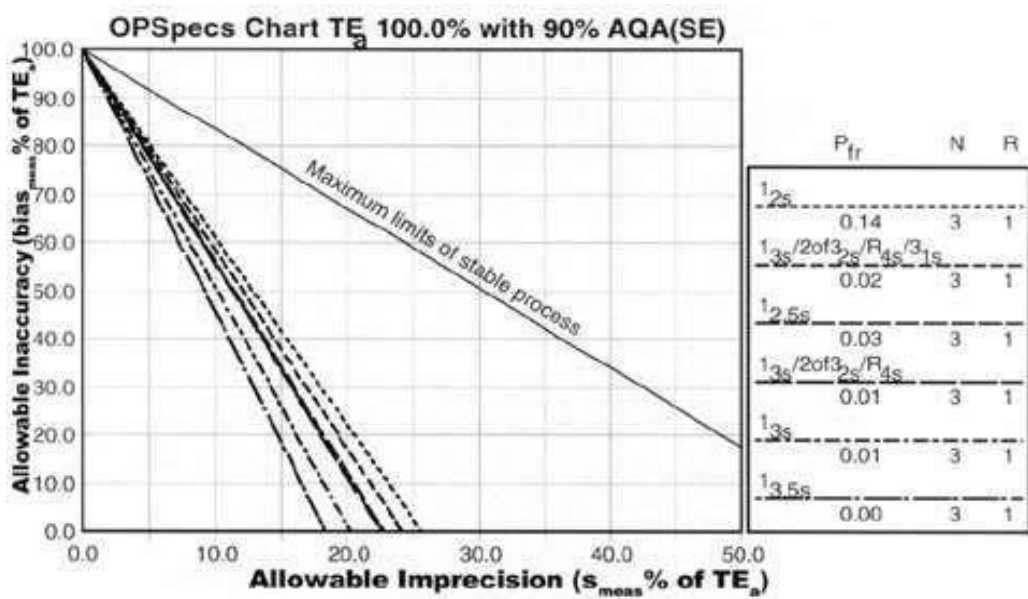


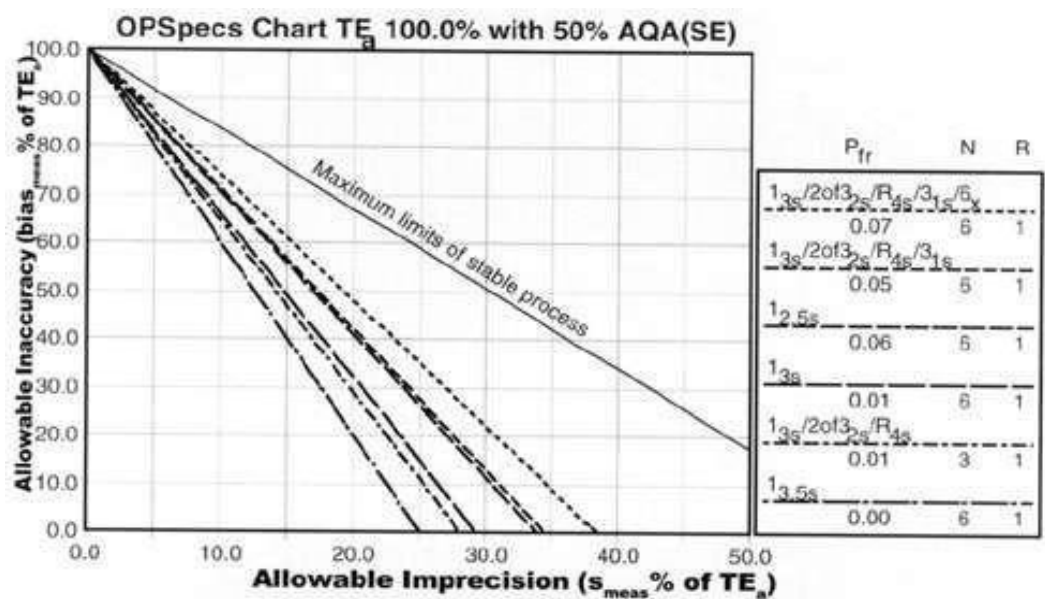
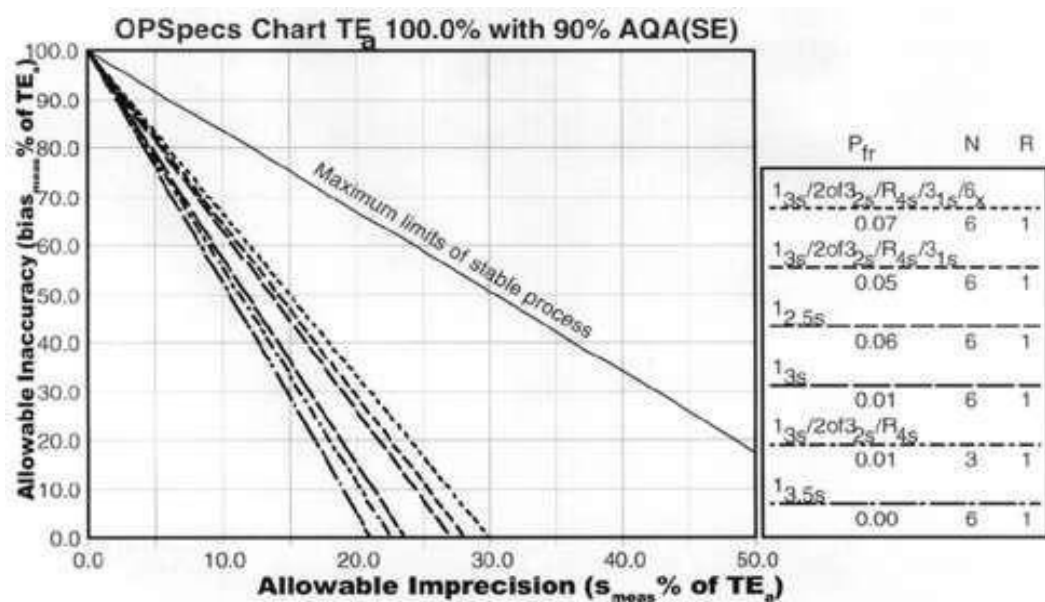












HEMATOLOGY

Test or Analyte	Acceptable Performance
Cell identification	90% or greater consensus on identification
White cell differentiation	Target \pm 3 SD based on percentage of different types of white cells
Erythrocyte count	Target \pm 6%
Hematocrit	Target \pm 6%
Hemoglobin	Target \pm 7%
Leukocyte count	Target \pm 15%
Platelet count	Target \pm 25%
Fibrinogen	Target \pm 20%
Partial thromboplastin time	Target \pm 15%
Prothrombin time	Target \pm 15%

USA-CLIA '88 (Fuente: <http://www.westgard.com>)

Analyte		Biological Variation		Desirable specification		
		CVw	CVg	I(%)	B(%)	TE(%)
B-	Erythrocytes, count	3.2	6.1	1.6	1.7	4.4
B-	Red cell distribution wide (RDW)	3.5	5.7	1.8	1.7	4.6
B-	Hematocrito	2.8	6.4	1.4	1.7	4.1
B-	Hemoglobin	2.8	6.6	1.4	1.8	4.1
B-	Hemoglobin A1 C	3.4	5.1	1.7	1.5	4.3
(B)Erythr-	Mean corpuscular hemoglobin (HCM)	1.6	5.2	0.8	1.4	2.7
(B)Erythr-	Mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC)	1.7	2.8	0.9	0.8	2.2
(B)Erythr-	Mean corpuscular volume (MCV)	1.3	4.8	0.7	1.2	2.3
B-	Leukocytes count	10.9	19.6	5.5	5.6	14.6
B-	Neutrophyles, count	16.1	32.8	8.1	9.1	22.4
B-	Lymphocytes, count	10.4	27.8	5.2	7.4	16.0
B-	Eosinophils, count	21.0	76.4	10.5	19.8	37.1
B-	Monocytes, count	17.8	49.8	8.9	13.2	27.9
S-	Basophile, count	28.0	54.8	14.0	15.4	38.5
B-	Platelets, count	9.1	21.9	4.6	5.9	13.4
B-	Platelet distribution wide	2.8	---	1.4	---	---
B-	Plateletcrit	11.9	---	6.0	---	---
(B)Plat-	Mean platelet volume (MPV)	4.3	8.1	2.2	2.3	5.8

European Biologic Goals and Calculated Biologic Allowable total Errors (Fuente: <http://www.westgard.com>)