

# **Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico**

**México, Abril de 2008**

**Derechos reservados ©**

# PRESENTACIÓN

Durante la evaluación de la competencia técnica de los laboratorios clínicos, la demostración de la validación y verificación de los procedimientos de examen requiere la aplicación de criterios técnicos uniformes y consistentes.

Con el propósito de desarrollar criterios técnicos para uno de los componentes en la evaluación de la trazabilidad e incertidumbre de las mediciones en este tipo de laboratorios, la entidad mexicana de acreditación, a. c., solicitó al Centro Nacional de Metrología su participación en la elaboración de la “Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico”. Este trabajo ha sido realizado con el financiamiento del Fondo de Apoyo para la Micro, Pequeña y Mediana Empresa (FONDO PYME), auspiciado por la Secretaría de Economía mediante el proyecto aprobado con folio FP2007-1605 de nombre “Elaboración de Guías Técnicas sobre Trazabilidad e Incertidumbre para la medición que permitan el fortalecimiento del Sistema Nacional de Acreditación de Laboratorios de ensayo y calibración”, El Subcomité de evaluación de Laboratorios Clínicos participó en la elaboración de la Guía y su participación está orientada a transmitir sus conocimientos y experiencias técnicas en la puesta en práctica de las Políticas de Trazabilidad y de Incertidumbre establecidas por ema, mediante el consenso de sus grupos técnicos de apoyo. La incorporación de estos conocimientos y experiencias a las Guías, las constituyen en referencias técnicas para usarse en la evaluación de la competencia técnica de los laboratorios clínicos.

En este trabajo, el CENAM se ocupa, entre otras actividades, de proponer criterios técnicos sobre la materia, validar los documentos producidos, procurar que todas las opiniones pertinentes sean apropiadamente consideradas y asegurar la consistencia de la Guía con los documentos de referencia indicados al final de este documento.

La elaboración de esta Guía está vinculada con la responsabilidad que comparten los laboratorios clínicos acreditados de ofrecer servicios con validez técnica, en el marco de la evaluación de la conformidad, tomando en cuenta que la información que transmiten a los médicos es fundamental para permitirles brindar servicios con la calidad y confiabilidad que requieren los pacientes.

La calidad de estos servicios se apoya en la confiabilidad y uniformidad de las mediciones, cuyo fundamento está establecido en la trazabilidad y en la evaluación de la incertidumbre de las mismas. Esta Guía es una referencia técnica en la que encontrarán un apoyo para el aseguramiento de las mediciones los que realizan la práctica rutinaria de los servicios acreditados de medición, así como los que evalúan la competencia técnica de los laboratorios.

La Guía para la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos empleados por el laboratorio clínico, no reemplaza a los documentos de referencia en que se

fundamentan las políticas de trazabilidad e incertidumbre de ema. La Guía aporta criterios técnicos que servirán de apoyo a la aplicación de la norma NMX-EC-15189-IMNC vigente. La consistencia de la Guía con esta norma y con los demás documentos de referencia, permitirá lograr el propósito de asegurar la confiabilidad y validez técnica de los resultados emitidos por los laboratorios clínicos.

**Dr. Héctor O. Nava Jaimes**  
Director General.  
Centro Nacional de Metrología

**María Isabel López Martínez.**  
Directora Ejecutiva.  
entidad mexicana de acreditación, a.c.

## **AGRADECIMIENTOS.**

La entidad mexicana de acreditación expresa su reconocimiento al Fondo de Apoyo para la Micro, Pequeña y Mediana Empresa (FONDO PYME), auspiciado por la Secretaría de Economía, por haber proporcionado los recursos financieros para la elaboración de este documento, mediante el proyecto aprobado con folio FP2007-1605 de nombre “Elaboración de guías técnicas sobre trazabilidad e incertidumbre para la medición que permitan el fortalecimiento del Sistema Nacional de Acreditación de Laboratorios de Ensayo y Calibración” y por este medio hace patente su sincero reconocimiento y agradecimiento a la Secretaría de Economía, a la Subsecretaría para la Pequeña y Mediana Empresa, a la Dirección General de Desarrollo Empresarial y Oportunidades de Negocio, y a los profesionales que aportaron su tiempo y conocimiento en su desarrollo, destacando a los responsables de la elaboración:

**BARLANDAS RENDÓN, Nicolás Rogelio Eric, - Universidad Autónoma de Guerrero.**

**QUINTANA PONCE, Sandra, - Laboratorio BIOCLIN, S.A. de C.V.**

**REYES RAMÍREZ, Ignacio, - Laboratorio Clínico Profesional Reforma, S.A. de C.V.**

**LARA RODRÍGUEZ, Emma Eugenia, - Biomédica de Referencia, S.A. de C.V.**

**GUDIÑO RAMÍREZ, Ángela, - CARPERMOR, S.A. de C.V.**

**ROSAS GARCÍA, Eva, - entidad mexicana de acreditación, a.c.**

**BALDERAS ESCAMILLA, Miryan, - CENAM.**

**MITANI NAKANISHI, Yoshito, - CENAM.**

**PÉREZ URQUIZA, Melina, - CENAM.**

La entidad mexicana de acreditación reconoce de manera especial el esfuerzo y constancia de los tres primeros autores, quienes impulsaron el desarrollo de esta guía en todas sus fases de elaboración.

# ÍNDICE

|  |    |
|--|----|
| PRESENTACIÓN .....   | 2  |
| AGRADECIMIENTOS.....   | 4  |
| 1.0 INTRODUCCIÓN .....   | 6  |
| 2. OBJETIVO .....  | 6  |
| 3.0 ALCANCE.....   | 6  |
| 4.0 TÉRMINOS Y DEFINICIONES.....   | 7  |
| 5.0 RESPONSABILIDADES .....  | 13 |
| 6.0 DESCRIPCIÓN .....  | 13 |
| 6.1 Validación de los procedimientos de examen .....   | 13 |
| 6.2 Verificación de los parámetros de desempeño de los procedimientos de examen.....                                       | 14 |
| 7.0 PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE<br>DESEMPEÑO DEL PROCEDIMIENTO DE EXAMEN. ....                   | 15 |
| 7.1 Linealidad.....  | 15 |
| 7.1.1 Procedimiento para evaluar la linealidad .....   | 15 |
| 7.1.1.1 Consideraciones generales .....  | 15 |
| 7.1.1.2 Procedimiento para la preparación de las diluciones .....  | 16 |
| 7.1.1.3 – Número de mediciones por dilución .....  | 16 |
| 7.1.2 – Evaluación de la linealidad.....   | 16 |
| 7.1.3 Validación del intervalo reportable (intervalo validado) .....   | 18 |
| 7.1.4 Criterio de aceptabilidad .....  | 19 |
| 7.2 Precisión .....  | 19 |
| 7.2.1 Criterios para verificar la precisión.....   | 20 |
| 7.2.2 Criterio de aceptabilidad .....  | 20 |
| 7.2.2.1 Acorde al fabricante .....   | 20 |
| 7.2.2.2 Precisión acorde a criterios del Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA). ...                            | 20 |
| 7.3. - Veracidad .....   | 21 |
| 7.3.1 Criterios para verificar la veracidad .....  | 22 |
| 7.3.1.1 Evaluación de la veracidad a través de la valoración de un material de referencia<br>certificado.....              | 22 |
| 7.3.1.1.1 Valoración por el cálculo del error relativo.....  | 22 |
| 7.3.1.1.2 Valoración por el cálculo del porcentaje de recuperación .....   | 23 |
| 7.3.1.2 Evaluación de la veracidad utilizando estudios de comparación de métodos.....                                      | 23 |
| 7.3.1.2.1 Procedimiento.....   | 24 |
| 7.3.1.2.2 Evaluación y criterio de aceptabilidad .....   | 25 |
| 7.3.1.3 Estudios de comparación interlaboratorio con base en los resultados de los programas de<br>ensayos de aptitud..... | 29 |
| 7.4 Incertidumbre .....  | 30 |
| 8 BIBLIOGRAFÍA .....   | 31 |
| 9 MATERIAL DE LECTURA ADICIONAL.....   | 33 |
| ANEXO EJEMPLOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE<br>VERIFICACIÓN.....  | 34 |

## **1.0 INTRODUCCIÓN**

La presente guía, es el resultado de un consenso del grupo de trabajo de los laboratorios clínicos de la ema, que describe los puntos a considerar para la validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativos que se realizan en el laboratorio clínico, para el cumplimiento y evaluación del punto 5.5.2 de la norma NMX-EC-15189-IMNC-2006 / ISO 15189:2003.

## **2.0 OBJETIVO**

Establecer las directrices para llevar a cabo la validación y la verificación de los procedimientos de examen cuantitativos que se realizan en el laboratorio clínico, los cuales pueden estar basados en métodos:

2.1 - Publicados en libros emitidos por alguna autoridad en la materia (por ejemplo: ICH, ILAC, ISO, IUPAC, NCCLS, IFCC), métodos establecidos o autorizados por organismos científicos nacionales o internacionales (ejemplo: NOM-199-SSA1-2000), publicados en artículos o revistas especializadas, métodos revisados por pares o publicados en directrices internacionales, regionales o nacionales, así como los métodos de examen especificados por el fabricante del equipo, todos éstos con información previa de validación.

2.2 - Mencionados en el inciso 2.1, que sean empleados fuera de su alcance previsto o ampliaciones y modificaciones a los mismos.

2.3 - Desarrollados o diseñados por el propio laboratorio.

Los mencionados en el inciso 2.1, deben como parte de su implementación por el laboratorio clínico, ser verificados en su desempeño contra las especificaciones de la validación para confirmar su desempeño analítico cuando se aplica bajo las condiciones operativas del propio laboratorio y determinar que es adecuado para el propósito.

Los mencionados en los incisos 2.2 y 2.3 deben ser adecuadamente validados, documentados y autorizados antes de su uso, por el laboratorio clínico con el propósito de confirmar su desempeño analítico y para determinar su adecuación para el uso deseado.

## **3.0 ALCANCE**

Esta guía la deben aplicar los laboratorios clínicos que se encuentren en alguna etapa del proceso de acreditación ante la ema, a todos los procedimientos de examen cuantitativos del alcance de la acreditación, aún cuando dichos procedimientos ya estén implementados previamente en el laboratorio, así como, cada vez que se cambie, modifique o se implemente un método de examen.

## **4.0 TÉRMINOS Y DEFINICIONES**

### **4.1 Adecuado para el propósito:**

Grado en el que los datos resultantes de un proceso de medición le permiten al usuario tomar decisiones técnica y administrativamente correctas para el propósito establecido.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

### **4.2 Ámbito lineal:**

Es la parte de la función de calibración en la que la señal obtenida para el analito responde “linealmente” a la concentración. Se verifica mediante la obtención de un coeficiente de correlación mayor o igual a 0,995.<sup>6</sup> (Metrología en el laboratorio clínico)

### **4.3 Analito:**

Especie de interés a determinar en un análisis.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

### **4.4 Calibración:**

Conjunto de operaciones que establecen, en condiciones especificadas, la relación entre los valores de las magnitudes indicadas por un instrumento de medición o un sistema de medición, o los valores representados por una medida materializada o un material de referencia, y los valores correspondientes de la magnitud realizada por los patrones.<sup>21</sup> (NMX-Z-055-1997-IMNC)

### **4.5 Corrida:**

Conjunto de muestras analizadas en forma continua, bajo las mismas condiciones experimentales.<sup>22</sup> (NOM-177-SSA1-1998)

### **4.6 Desviación/Sesgo:**

Error sistemático de un proceso de medición.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

### **4.7 Ensayo/Prueba:**

Determinación de una o más características de acuerdo con un procedimiento.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

### **4.8 Especificidad:**

Es la capacidad de determinar el analito inequívocamente en la presencia de componentes los cuales se espera que estén presentes. Comúnmente puede incluir impurezas, degradantes, matriz, etc.<sup>10</sup> (Métodos Analíticos Adecuados a su propósito, CENAM, 1998)

### **4.9 Evidencia objetiva:**

Datos que respaldan la existencia o veracidad de algo.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005)

#### **4.10 Exactitud de medición:**

Grado de la concordancia entre el resultado de una medición y un valor verdadero (o real) de lo medido (el mensurando).<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.11 Exactitud relativa:**

Grado de concordancia entre los resultados del método evaluado y los obtenidos utilizando un método de referencia reconocido.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo)

#### **4.12 Incertidumbre de medición:**

Parámetro asociado al resultado de una medición, que caracteriza la dispersión de los valores que podrían razonablemente, ser atribuidos al mensurando.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.13 Intervalo de trabajo:**

Intervalo de las concentraciones analíticas o los valores de las propiedades sobre las cuales el método va a ser aplicado. Dentro del intervalo de trabajo puede existir un intervalo de respuesta lineal, en el que, la señal de respuesta sistema de medición tendrá una relación lineal con la concentración del analito o el valor de la propiedad.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

**Nota 1.** Se refiere al intervalo de concentración del parámetro de interés, para el cual el método se considera aplicable.

**Nota 2.** El intervalo validado es el intervalo de concentración del analito dentro del cual el método puede considerarse válido.

**Nota 3.** Se debe tener en cuenta que el intervalo de medición para un determinado parámetro, varía de un método a otro, e incluso dentro de un mismo método es posible aún realizar variaciones del intervalo cambiando algunas de las variables de medición. No obstante, la validación de un método analítico implica la definición del intervalo o intervalos de medición.

#### **4.14 Límite de cuantificación:**

Es aquel valor de concentración mínimo que puede obtenerse con una imprecisión aceptable.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.15 Límite de detección:**

Concentración mínima de un analito en la matriz de una muestra que puede ser detectada, pero no necesariamente cuantificada, bajo condiciones analíticas específicas.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.16 Linealidad:**

La capacidad (dentro de un intervalo dado) para proporcionar resultados que son directamente proporcionales a la concentración del analito en las muestras de examen.<sup>14</sup> (NCCLS Document EP6A)

El término linealidad aplicado a un método analítico, se refiere al tramo de concentraciones del analito en el que la respuesta del sistema de medición es una función lineal de la concentración; la representación gráfica de este tramo



(concentraciones frente a respuestas) debe exhibir una buena correlación de los puntos experimentales a la recta de regresión para que el método analítico en cuestión sea aceptable.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.17 Magnitud (medible):**

Atributo de un fenómeno, de un cuerpo o de una sustancia, que es susceptible de distinguirse cualitativamente y de determinarse cuantitativamente.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.18 Material de referencia (MR):**

Material o sustancia cuyo(s) valor(es) es(son) suficientemente homogéneo(s) y bien definido(s) para permitir su uso para la calibración de un instrumento, la evaluación de un método o la atribución de valores a los materiales.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.19 Material de referencia certificado (MRC):**

Material de referencia acompañado de un certificado cuyo(s) valor(es) de la(s) propiedad(es) es(son) certificado(s) por un procedimiento que establece su trazabilidad a una realización exacta de la unidad en la cual los valores de propiedad son expresados y para la cual cada valor certificado está acompañado de una incertidumbre a un nivel de confiabilidad indicado.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.20 Medición:**

Conjunto de operaciones que tienen por finalidad determinar el valor de una magnitud.<sup>21</sup> (NMX-Z-055-IMNC-2005)

#### **4.21 Mensurando:**

Magnitud particular sometida a medición.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.22 Método de medición:**

Secuencia lógica de las operaciones, descritas de manera genérica, utilizada en la ejecución de las mediciones.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.23 Método de referencia:**

Método ampliamente investigado, que describe clara y exactamente las condiciones y procedimientos necesarios, para la medición de uno o más valores de la propiedad, que han demostrado tener exactitud y precisión de acuerdo con su propósito de uso y que puede, por lo tanto, ser usado para evaluar la exactitud de otros métodos por la misma medición, permitiendo en particular la caracterización de un Material de Referencia.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.24 Método desarrollado por el laboratorio:**

Método analítico que no se encuentra en normas u otras colecciones de métodos, ni en publicaciones de terceros, habiendo sido desarrollado por el propio laboratorio.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo)

**Nota:** El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

#### **4.25 Método no normalizado:**

Método analítico desarrollado por un tercero o que ha sido adaptado por el laboratorio a partir de un método normalizado.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005)

**Nota:** El desarrollo del método, así como su adaptación, incluyen la etapa de su validación.

#### **4.26 Método normalizado:**

Método analítico desarrollado por un organismo de normalización u otro organismo reconocido cuyos métodos son generalmente aceptados por el sector técnico correspondiente.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005)

**Nota.** El desarrollo del método incluye la etapa de su validación.

#### **4.27 Muestra blanco:**

Material que es similar en matriz y estado físico de preparación a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema, pero que no contiene el analito nativo y que es usado con el propósito de dar seguimiento a diferentes aspectos del proceso analítico.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005)

#### **4.28 Muestra de control:**

Material de composición conocida usado con el propósito de dar seguimiento al proceso analítico, que debe ser similar a las muestras que están siendo analizadas como muestras problema, en cuanto a la matriz, y al estado físico de preparación y el intervalo de concentración del analito.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005)

#### **4.29 Parámetros de desempeño del método:**

Son las propiedades, características o capacidades cuantificables del método que indican su grado de calidad; incluyen: exactitud, efecto de matriz, repetibilidad, reproducibilidad, especificidad, límite de detección, límite de cuantificación, linealidad, intervalo analítico, sensibilidad, robustez. Todas estas características relacionadas con los resultados obtenibles por el método.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005)

#### **4.30 Precisión:**

Grado de concordancia entre los valores de una serie repetida de ensayos, utilizando una muestra homogénea, bajo condiciones establecidas.<sup>23</sup> (Política de selección y validación de métodos de ensayo, Oficina de Acreditación Guatemala, 2005)

#### **4.31 Procedimiento de medición:**

Conjunto de operaciones, descritas de forma suficientemente detallada, que se utilizan para la ejecución de mediciones particulares de acuerdo a un método dado.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

**Nota 1:** Un procedimiento de medición es usualmente descrito en un documento, llamado algunas veces “procedimiento” y que proporciona suficientes detalles para que un operador pueda realizar una medición sin necesitar más información.

#### **4.32 Recuperación:**

La recuperación es el cociente entre la cantidad de analito medida y el contenido en la muestra. En el caso ideal, se obtiene un 100%. En mediciones experimentales puede perderse analito especialmente en el caso de tratamientos complejos de muestras con analito en cantidades traza, dando lugar a porcentajes de recuperación menores (importante especialmente en el caso de procedimientos cromatográficos).<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.33 Repetibilidad:**

Grado de concordancia entre los resultados de mediciones sucesivas de un mismo mensurando, llevadas a cabo totalmente bajo las mismas condiciones de medición.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

**Nota:** Las condiciones de repetibilidad incluyen: el mismo procedimiento, analista/observador, ubicación, instrumento y condiciones de medición. Por mediciones sucesivas se entiende aquellas mediciones repetidas dentro de un corto período de tiempo.

#### **4.34 Reproducibilidad:**

Grado de concordancia entre los resultados de los resultados de mediciones del mismo mensurando, realizadas en diferentes condiciones de medición.

**Nota:** Una declaración válida de reproducibilidad requiere que se especifiquen los cambios en las condiciones del análisis o calibración. Estos cambios pueden incluir: el principio en que se basa la medición, el método, analista/observador e instrumento, material y patrones de referencia, ubicación, condiciones de uso y tiempo.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.35 Robustez:**

Capacidad de un procedimiento analítico de no ser afectado por pequeñas pero deliberadas variaciones en los parámetros del método, provee una indicación de su confiabilidad en condiciones de uso normales.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.36 Selectividad:**

La habilidad de un método para determinar exactamente y específicamente el analito de interés en la presencia de otros componentes en la matriz bajo condiciones establecidas de prueba.<sup>10</sup> (Métodos Analíticos Adecuados a su Propósito)

**Nota 1** Selectividad Cualitativa.- Término que indica hasta qué punto otras sustancias interfieren en la determinación de una sustancia de acuerdo a un procedimiento dado.

**Nota 2** Selectividad Cuantitativa.- Un término usado en conjunción con otros sustantivos (por ejemplo constante, coeficiente, índice, factor, número) para la caracterización cuantitativa de interferencias.

#### **4.37 Sensibilidad Analítica (o metrológica):**

Es la relación entre la señal obtenida de un sistema de medición y la correspondiente concentración de analito, es decir, la pendiente de la función de calibración y no es sinónimo de límite de detección. Cuando la función de calibración es una recta, la sensibilidad analítica es constante en todo el intervalo de medida. Por el contrario, con funciones de calibración diferentes de la recta, la sensibilidad varía en función de la concentración del analito. El valor absoluto de sensibilidad analítica tiene utilidad para comparar entre sí diferentes procedimientos de medida o métodos basados en la medición de una misma señal física. Cuando se trata de funciones de calibración que no corresponden a una recta, la sensibilidad debe especificarse para una concentración determinada de analito o en forma de función de la concentración de analito.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.38 Validación:**

Confirmación mediante el suministro de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos del método para una utilización o aplicación específica prevista.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.39 Valor de Referencia Aceptado:**

Valor que sirve como referencia consensuada para la comparación, obtenido a partir de:

- a.- Un valor teórico o establecido, con base en principios científicos.
- b.- Un valor asignado o certificado, con base en trabajos experimentales de alguna organización nacional o internacional.
- c.- Un valor certificado o consensuado, con base en trabajos de colaboración experimental bajo los auspicios de algún grupo científico o técnico.
- d.- Cuando no se dispone de a, b, ó c, el valor supuesto de la magnitud (medible); por ejemplo, la media de una población especificada de mediciones.<sup>18</sup> (NMX-CH-5725-1-IMNC-2006).

#### **4.40 Valor Observado:**

Valor de un mensurando obtenido como resultado de una observación simple.<sup>18</sup> (NMX-CH-5725-1-IMNC-2006).

#### **4.41 Veracidad:**

Grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia.<sup>18</sup> (NMX-CH-5725-1-IMNC-2006)

Se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también llamado “sesgo” o “desviación”; que puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

#### **4.42 Verificación:**

Confirmación mediante la aportación de evidencia objetiva de que se han cumplido los requisitos especificados para un método.<sup>15</sup> (NMX-CC-9000-IMNC-2000)

La verificación consiste en evaluar el desempeño del método para demostrar que cumple con los requisitos para el uso previsto, que fueron especificados como resultado de su validación.<sup>17</sup> (NMX-CH-152-IMNC-2005)

## **5.0 RESPONSABILIDADES**

Es responsabilidad de los laboratorios clínicos en proceso de acreditación o acreditados, el seguir los lineamientos de esta guía en todos los procedimientos de examen cuantitativos establecidos en el alcance de la acreditación del laboratorio clínico.

Así mismo, es responsabilidad de los evaluadores y expertos técnicos que participan en los procesos de acreditación el verificar la aplicación de esta guía.

## **6.0 DESCRIPCIÓN**

Generalmente para la medición de un analito en un tipo específico de muestra existen varios métodos analíticos disponibles. Es importante que el laboratorio usuario de la metodología evalúe los diferentes métodos y seleccione aquel que mejor se adecue a las necesidades y recursos.

### **6.1 Validación de los procedimientos de examen**

La realización de las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen utilizados por el propio laboratorio, contemplan la satisfacción de las necesidades metrológicas requeridas por el médico para un adecuado tratamiento del paciente. Un laboratorio clínico acreditado o en proceso de acreditación debe demostrar que tiene competencia técnica para realizar las actividades de validación y verificación de los procedimientos de examen cuantitativo establecidos en su alcance de acreditación.

La validación comprueba la aptitud de los procedimientos de examen y refleja las condiciones reales de la aplicación de los mismos. Los datos de esta validación los informa el fabricante en los instructivos de uso de los reactivos. No obstante, el laboratorio debe verificar que puede aplicar correctamente los métodos ya validados

por el fabricante, previo a su uso en los exámenes, bajo sus condiciones propias de operación (equipo, calibradores, analistas, etc.) generando evidencias objetivas, para confirmar su aplicación correcta.<sup>24</sup> Adicionalmente, cuando sea posible, el laboratorio debe presentar una comparación de la información proporcionada por el fabricante respecto de la información disponible en bibliografía científica sobre el mismo método de medición, con el propósito de asegurar la confiabilidad de la validación de los procedimientos de examen.

Antes de realizar la validación y/o verificación en la rutina del laboratorio, debe llevarse a cabo la calibración analítica de los equipos.

La validación y/o verificación de un procedimiento de examen depende de los cambios realizados, por lo que debe repetirse cuando existan cambios mayores.

Se consideran cambios mayores, el cambio de equipo y mantenimiento mayor de equipo, entre otros. Se consideran cambios menores, la modificación del tamaño de muestra, cambio de analista y sustitución de reactivos, entre otros.<sup>23</sup>

Esta información debe incluir los siguientes parámetros:

- Linealidad (intervalo analítico)
- Precisión
- Veracidad
- Limite de detección
- Selectividad
- Sensibilidad analítica
- Intervalo de trabajo
- Especificidad analítica
- Incertidumbre

Si la información no se encuentra completa en los insertos, el laboratorio debe presentar evidencia documentada y actualizada de que la ha solicitado al fabricante.<sup>14</sup>

En el caso de realizar modificaciones a métodos establecidos o ya validados por el fabricante o cuando se utilicen métodos desarrollados por el propio laboratorio (internos), éste debe realizar la validación completa del método y presentar las evidencias correspondientes, incluyendo el procedimiento que utilizó para realizarla.<sup>27</sup>

## **6.2 Verificación de los parámetros de desempeño de los procedimientos de examen**

El laboratorio debe realizar la verificación de los procedimientos de examen seleccionados antes de ponerlos en uso y evidenciar si éstos cumplen con las características de desempeño en las condiciones del laboratorio. La verificación también se debe realizar cada vez que se realice un cambio mayor en algún procedimiento de examen que ya hubiera sido verificado anteriormente.

Para el propósito de esta guía, esta verificación debe incluir los parámetros siguientes:<sup>6,14</sup>

- Linealidad (intervalo analítico)

- Precisión
- Veracidad
- Incertidumbre

Si el laboratorio considera que alguno de los parámetros para la verificación de los procedimientos de examen, no aplica en función al método seleccionado, esta decisión debe ser justificada técnicamente.

## **7.0 PROCEDIMIENTO PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE DESEMPEÑO DEL PROCEDIMIENTO DE EXAMEN.**

### **7.1 Linealidad**

Es importante evaluar dentro del intervalo analítico de los procedimientos de medición implementados por un laboratorio, los resultados máximo y mínimo que pueden ser reportados.

Los fabricantes emiten valores para la linealidad (el intervalo reportable), por lo que es necesario confirmar mediante el suministro de evidencia objetiva que los valores reportados por el laboratorio utilizando dicho procedimiento de medición muestran un comportamiento lineal.<sup>14</sup>

El experimento de linealidad involucra una serie de muestras de concentración conocida o una serie de diluciones conocidas de muestras altamente concentradas. Las mediciones o los valores de las pruebas reportadas son comparados con los valores asignados o los valores de dilución. La linealidad es obtenida al trazar la mejor línea recta que toque la mayor cantidad de puntos.<sup>11, 27</sup>

Debe considerarse que dicha verificación debe tocar los puntos de decisión clínica, entendiéndose éstos como las concentraciones o actividades de los analitos donde el médico decide entre administrar o no algún tratamiento terapéutico.<sup>1, 27</sup>

#### **7.1.1 Procedimiento para evaluar la linealidad**

##### **7.1.1.1 Consideraciones generales**

Para realizar la evaluación de la linealidad, se deben preparar disoluciones patrón en 5 niveles de concentración,<sup>14</sup> aún cuando se puede hacer con 4 como mínimo.<sup>27</sup> En el caso que desee hacerse con más de 5 niveles, no existe restricción alguna.

Para preparar las disoluciones debe emplearse material de referencia certificado, en caso de no contar con dicho material, pueden utilizarse calibradores con valores asignados, los cuales podrán ser los mismos o diferentes con los que se calibró el equipo analítico, sueros control bajo y alto o muestras de pacientes analizadas rutinariamente en el laboratorio, siempre y cuando un par de ellas presenten: una baja

concentración del analito a ser evaluado en una de ellas y una concentración alta en la otra.<sup>27</sup>

Por lo que una vez definidas las muestras a utilizar, la asignación final del valor será obtenido calculando la media aritmética de un triplicado. Estos valores corresponderán a la dilución No. 1, concentración baja y dilución No. 5, concentración alta, de la tablas 1 y 2.

### 7.1.1.2 Procedimiento para la preparación de las diluciones

La preparación de las disoluciones patrón debe realizarse de acuerdo a la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de las diluciones

| Número de dilución | Proporción en volumen de la muestra 1 | Proporción en volumen de la muestra 2 |
|--------------------|---------------------------------------|---------------------------------------|
| 1                  | Usar sin diluir                       | 0                                     |
| 2                  | 3                                     | 1                                     |
| 3                  | 2                                     | 2                                     |
| 4                  | 1                                     | 3                                     |
| 5                  | 0                                     | Usar sin diluir                       |

**Nota.-**

Muestra 1. (M<sub>1</sub>) concentración baja preferentemente cercana a cero.

Muestra 2. (M<sub>2</sub>) concentración alta.

La matriz del diluyente debe ser mantenida, preferentemente utilizar suero humano.<sup>27</sup>

Para preparar disoluciones patrón para distintos niveles de concentración, se debe modificar/ cambiar/adecuar el protocolo de preparación de las diluciones de manera correspondiente al número de niveles involucrados.

### 7.1.1.3 – Número de mediciones por dilución

Se recomienda hacer cuatro replicas, sin embargo un número de tres es suficiente.<sup>27</sup>

Es importante que se prepare un volumen mínimo por dilución que garantice realizar las replicas programadas y el “volumen muerto” (lo que queda en la celda de reacción) que necesitan sobretodo los equipos automatizados para su lectura.

### 7.1.2 – Evaluación de la linealidad

- a) Obtener las medias de la concentración o de la actividad de acuerdo a la tabla 2.



Tabla 2. Resultados de la concentración o de la actividad de las diluciones respectivas

| Número de dilución | Resultados de la concentración o de la actividad |   |   | Media |
|--------------------|--|---|---|-------|
|                    | 1  | 2 | 3 |       |
| 1                  |  |   |   |       |
| 2                  |  |   |   |       |
| 3                  |  |   |   |       |
| 4                  |  |   |   |       |
| 5                  |  |   |   |       |

b) Construir una gráfica con la media aritmética de las replicas sobre el eje Y (ordenadas), en función de la concentración (el valor conocido (calibradores) o asignado) sobre el eje X.<sup>14, 27</sup>

c) Para construir la gráfica emplear los siguientes criterios:

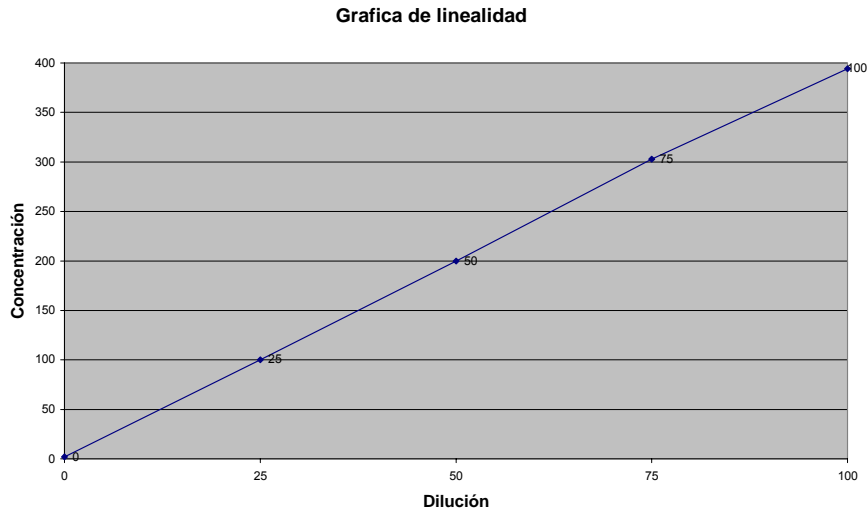
Marcar en el eje X, las concentraciones en función de  $M_2$  (0%, 25%, 50%, 75% y 100% de  $M_2$ ).

Marcar sobre el eje Y, la escala apropiada al intervalo de valores de las medias obtenidas para las diluciones.

Graficar las coordenadas de los puntos: (0%, media de la dilución 1), (25%, media de la dilución 2), (50%, media de la dilución 3), (75%, media de la dilución 4), (100%, media de la dilución 5).

d) Calcular la ecuación de la recta para los puntos dados, así como el coeficiente de correlación. La gráfica resultante deberá ser lineal, con un coeficiente de correlación de por lo menos del 0,99.<sup>11</sup> Este cálculo puede realizarse empleando las herramientas de análisis de datos del programa Excel, o bien, cualquier programa de estadística con el que cuente el laboratorio.

**Nota.** El **coeficiente de correlación** permite estimar la relación entre dos propiedades y de esta manera si los puntos experimentales siguen una función lineal.



**Nota:** La escala de valores de concentración estará en función de las concentraciones esperadas (obtenidas en el experimento), la escala que se muestra aquí, de 0 a 400 es una escala arbitraria solo para ejemplificar.

### 7.1.3 Validación del intervalo reportable (intervalo validado)

- a) Llenar la columna 2 en la tabla 3 correspondiente a las medias obtenidas en la tabla 2.
- b) Calcular los valores teóricos de las abscisas ( $x$ ), usando la dilución tres como el valor verdadero en caso que la muestra 1 tenga cero de concentración o actividad enzimática, o bien un valor muy cercano a cero.<sup>27</sup> Si esto no se cumple entonces considerar los valores extremos para calcular los valores teóricos siempre y cuando se hayan utilizado sueros control o muestras de pacientes. En caso que se hayan usado materiales de referencia certificados o calibradores, se deberán usar los valores asignados a dicho calibrador.
- c) Graficar utilizando los valores obtenidos teóricamente en el eje  $X$  y el valor de las medias de concentración de la tabla 2 en el eje  $Y$ . Graficar la columna 2 vs la columna 3 de la tabla 3, la columna 2 en  $Y$  (valores medios de concentración) y la columna 3 en  $X$  (valores teóricos).
- d) Calcular la ecuación de la línea y obtener la pendiente y la ordenada al origen.

El sesgo (desviación) para cada nivel es calculado por la diferencia del valor de la media de cada dilución y su valor teórico, cuyo valor será colocado en la columna 4 de la tabla 3.

El porcentaje de error se puede calcular dividiendo el sesgo (desviación) entre el valor teórico y el resultado es multiplicado por 100.

**Nota:** Si el valor de la dilución 1 es cero entonces el % de error no aplica (NA).

Tabla 3. Cuantificación de errores en el intervalo reportable

| Número de dilución | Media de los valores de concentración (Y) | Valor teórico (x)                       | Sesgo (desviación) | % Error                             |
|--------------------|---|---|--------------------|-------------------------------------|
| 1                  | Ingresar valor medio                      | $(M_1 \times 1) + (M_2 \times 0)$       | $y_1 - x_1$        | $[(\text{sesgo}_1)/x_1] \times 100$ |
| 2                  | Ingresar valor medio                      | $(M_1 \times 0,75) + (M_2 \times 0,25)$ | $y_2 - x_2$        | $[(\text{sesgo}_2)/x_2] \times 100$ |
| 3                  | Ingresar valor medio                      | $(M_1 \times 0,5) + (M_2 \times 0,5)$   | $y_3 - x_3$        | $[(\text{sesgo}_3)/x_3] \times 100$ |
| 4                  | Ingresar valor medio                      | $(M_1 \times 0,25) + (M_2 \times 0,75)$ | $y_4 - x_4$        | $[(\text{sesgo}_4)/x_4] \times 100$ |
| 5                  | Ingresar valor medio                      | $(M_1, x, 0) + (M_2, x, 1, 0)$          | $y_5 - x_5$        | $[(\text{sesgo}_5)/x_5] \times 100$ |

#### 7.1.4 Criterio de aceptabilidad

Calcular la pendiente y la ordenada al origen (la pendiente deseable es de 1,00 y la ordenada al origen de 0), finalmente comparar el sesgo (desviación) o el porcentaje de error para cada dilución con el error permitido para la prueba de acuerdo con la información del fabricante o del método donde el sesgo (desviación) y % de error deben ser menores que el error permitido y por último se deberá hacer la decisión de aceptar o rechazar.<sup>27</sup>

#### 7.2 Precisión

Para conocer el valor de una magnitud se emplea un procedimiento de medición, y los resultados que se obtienen son una estimación del valor del mensurando. Tal estimación contiene un error de medida, que es la diferencia entre el valor obtenido y el valor verdadero del mensurando.<sup>1, 5, 6, 24, 27</sup>

En el error de *medición* está involucrado el efecto de dos componentes:

- El error aleatorio, que se relaciona con la precisión del procedimiento de medición. Estos errores difieren en cualquier sentido del valor medio y afectan la reproducibilidad
- El error sistemático, que se relaciona con la veracidad del procedimiento de medición. Pueden existir varias fuentes de error sistemático, siendo algunos errores positivos y otros negativos, la suma de todos ellos se conoce como error sistemático total o sesgo de la medición.

Los errores aleatorios y sistemáticos pueden ocurrir independientemente unos de otros y surgir en diferentes etapas del procedimiento. El error aleatorio es más fácil de

detectar que el sistemático, ya que el segundo no se puede apreciar con la sola repetición de mediciones y, a menos que se conozca de antemano el valor verdadero del mensurando, podrían existir errores sistemáticos muy grandes, que pasen inadvertidos si no se aplican sistemas de control de calidad interno o se participa en programas de ensayos de aptitud (tales como los programas de evaluación externa de la calidad).

La precisión usualmente se especifica en términos de desviación estándar o desviación estándar relativa.

Para identificar la precisión en los procedimientos analíticos se deben realizar mediciones repetidas y aplicar algunos conceptos estadísticos fundamentales como el cálculo de la media ( $\bar{X}$ ), la desviación estándar (DE), la desviación estándar relativa (DER), el coeficiente de variación (%CV) y la varianza ( $s^2$ ).

### **7.2.1 Criterios para verificar la precisión**

Para evaluar la precisión el laboratorio debe aplicar alguna de las siguientes opciones:

a) Realizar el examen de un material (muestras de pacientes, muestras control, etc.) de valor conocido o no, analizado por lo menos 20 veces en forma continua, llamado intraserial o intracorrida o 20 veces en el transcurso del día (24 h) llamado intradía.<sup>14, 27</sup>

b) Utilizar 20 valores obtenidos uno cada día de la misma muestra de un paciente o bien obtenidos de una curva de un programa de control de calidad interno de 20 días diferentes y del mismo lote (interserial o intercorrida).

En ambos casos se debe calcular la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación expresado en porcentaje.

### **7.2.2 Criterio de aceptabilidad**

#### **7.2.2.1 Acorde al fabricante**

La precisión del método obtenida por el laboratorio debe ser menor o igual a la precisión del método que proporciona el fabricante.<sup>14</sup>

En caso de que sea mayor, el laboratorio deberá presentar la justificación estadística documentada de que no existe una diferencia significativa. La prueba F es apropiada para evaluar la precisión considerando una distribución normal.<sup>8</sup>

#### **7.2.2.2 Precisión acorde a criterios del Clinical Laboratory Improvement Amendments (CLIA).**

Los resultados en la corrida intraserial o en la intradía tendrán menor precisión que la interserial, por lo tanto el criterio de aceptabilidad debe ser diferente.

Para la precisión intraserial o intradía, la desviación estándar obtenida debe ser igual o menor a  $\frac{1}{4}$  del error total permitido esto es:

$$\text{DE intraserial o DE intradía} \leq 0,25 \text{ ET (error total permitido)}$$

De manera similar para la precisión interserial, la desviación estándar debe ser de  $\frac{1}{3}$  o menor del error total, esto es:

$$\text{DE interserial} \leq 0,33 \text{ ET (error total permitido)}$$

Una mayor desviación estándar implica un mayor coeficiente de variación y por lo tanto una mayor precisión del método analítico.

### 7.3. - Veracidad

El término veracidad, en la norma NMX-CH-5725-1-IMNC-2006 se define como el grado de concordancia existente entre la media aritmética de un gran número de resultados y el valor verdadero o aceptado como referencia.<sup>18</sup>

La veracidad se relaciona con la presencia de errores de tipo sistemático, también llamado “sesgo” o “desviación”; que puede expresarse como un valor absoluto o relativo al valor verdadero.<sup>5,6</sup>

La veracidad de un método de medición es de interés cuando es posible disponer del valor verdadero del mensurando sujeto a medición. El valor verdadero no se conoce exactamente en algunos métodos de medición, pero es posible contar con un valor de referencia certificado para el mensurando sujeto a medición; por ejemplo si se dispone de materiales de referencia adecuados, se establece el valor de referencia con base a otro método de medición o mediante la preparación de una muestra conocida. Se puede investigar la veracidad de un método de medición mediante la comparación del valor de referencia certificado con los resultados obtenidos por el método de medición. Normalmente la veracidad se expresa en términos de sesgo, en un análisis químico por ejemplo dicho sesgo se puede presentar si el método falla en extraer a todo el elemento de interés o si la presencia de un elemento interfiere en la determinación de otro.<sup>18</sup>

El término sesgo se ha utilizado durante mucho tiempo en cuestiones estadísticas, pero debido a que causo algunas objeciones de carácter filosófico en algunos campos profesionales (tales como la medicina y las leyes), se ha decidido acentuar el aspecto positivo usando veracidad como nuevo término.<sup>18</sup>

**Nota:** En algunos documentos la veracidad ha sido referida como la exactitud de la medición. Sin embargo, este uso no es recomendable.

El término exactitud se utilizó durante cierto tiempo para referirse únicamente a la componente ahora denominada veracidad, pero quedó claro para muchas personas que dicho término debía indicar el desplazamiento total de un resultado con respecto a su valor de referencia, debido tanto a los efectos aleatorios como a los sistemáticos.

Por lo anterior, el término general de exactitud se usa en esta guía para referirse conjuntamente, a la veracidad y a la precisión.<sup>5</sup>

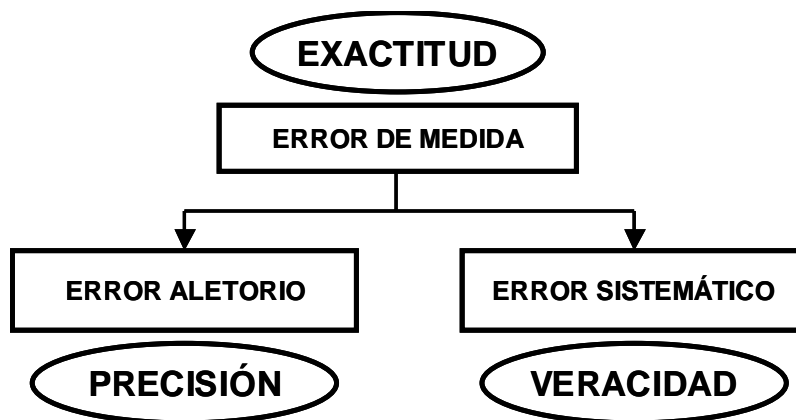


Figura nº.1 Relación entre los distintos tipos de error y los correspondientes conceptos cualitativos

### 7.3.1 Criterios para verificar la veracidad

Para verificar la veracidad de los métodos de examen cuantitativos que se emplean en el laboratorio clínico, se pueden utilizar las siguientes herramientas:<sup>18</sup>

- **Valoración de un material de referencia certificado**
  - a) Valoración por el cálculo del error relativo
  - b) Valoración por el cálculo de porcentaje de recuperación
- **Estudios de comparación de métodos**
- **Estudios de comparación interlaboratorios con base en los resultados de programas de ensayos de aptitud**

#### 7.3.1.1 Evaluación de la veracidad a través de la valoración de un material de referencia certificado.

##### 7.3.1.1.1 Valoración por el cálculo del error relativo

La veracidad de un método analítico se puede estimar por medio del error relativo, para lo cual se utiliza un material de referencia certificado (MRC), un material de referencia (MR), un calibrador o un suero con un valor conocido del analito, considerado el valor asignado a éste como el valor verdadero.

El cálculo del porcentaje de error relativo, se puede estimar mediante el cálculo inicial de la media aritmética desviación estándar y el coeficiente de variación de una muestra de suero usada, aplicando la siguiente fórmula:<sup>27</sup>

$$\% \text{ de error relativo} = \left[ \frac{(\text{Valor real} - \text{Valor de la medición})}{\text{Valor real}} \right] * 100$$

Entre menor sea el porcentaje de error relativo mayor será la veracidad del método.

El criterio de aceptabilidad es que el valor del error relativo sea menor o igual al reportado por el fabricante del equipo.

### **7.3.1.1.2 Valoración por el cálculo del porcentaje de recuperación**

Otra forma de verificar la veracidad es mediante la obtención de los valores esperados de los materiales de referencia ensayados.

Se puede utilizar material de referencia certificado, un material de referencia (MR) o un calibrador de valor conocido. El material se somete a examen 10 veces y se estima la concentración media del analito y con el valor obtenido se puede determinar el porcentaje de recuperación.<sup>27</sup>

$$\% \text{ recuperación} = \left[ \frac{\text{Valor obtenido}}{\text{Valor de referencia}} \right] \times 100$$

El porcentaje de recuperación tiene que ser igual o lo más cercano a 100. Valores menores indican menor cantidad recuperada del analito cuantificado y a mayor porcentaje mayor cantidad del analito recuperado.

El criterio de aceptación es que el valor sea menor o igual al reportado por el fabricante del instrumento.

### **7.3.1.2 Evaluación de la veracidad utilizando estudios de comparación de métodos**

Un experimento de comparación de métodos es utilizado para estimar el error sistemático. El plan del experimento consiste en analizar muestras de pacientes por 2 métodos, el de prueba y el de comparación, después de lo cual se estima el error sistemático basado en las diferencias observadas entre los métodos.<sup>27</sup>

Dichas diferencias deben ser determinadas en las concentraciones críticas de decisión médica; cabe mencionar que tanto el diseño del experimento, como los cálculos estadísticos utilizados son críticos para obtener estimaciones confiables de los errores sistemáticos.<sup>17, 27</sup>

Los métodos analíticos que serán usados en la comparación de métodos deben ser cuidadosamente seleccionados, un método de referencia debe ser elegido como el método de comparación, cuando esto sea posible.

Cuando existan diferencias entre el método de prueba y el método de comparación, dichas diferencias le son asignadas al método de prueba.<sup>17</sup>

Cuando la diferencia es pequeña entonces se dice que los dos métodos tienen relativamente la misma veracidad. Si la diferencia es grande y médicamente inaceptable, entonces es necesario identificar qué método es el inexacto o el exacto, para lo cual pueden ser utilizados experimentos de recuperación e interferencias.<sup>27</sup>

### 7.3.1.2.1 Procedimiento

**Número de muestras.** Para los experimentos de comparación de métodos un promedio de 40 muestras deben ser probadas por ambos métodos, la concentración del analito debe cubrir el intervalo reportable y el espectro de los valores utilizados para la decisión médica.

Un número mínimo de 20 muestras puede utilizarse siempre y cuando estas hayan sido seleccionadas de acuerdo al criterio anterior, ya que son preferibles pocas muestras basadas en su concentración a muchas muestras recibidas aleatoriamente por el laboratorio.<sup>27</sup>

***Nota:** la calidad del experimento y la estimación de los errores sistemáticos dependerá más de un amplio intervalo de prueba que de un gran número de resultados de prueba.*<sup>27</sup>

Las muestras deben ser ensayadas el mismo día o lo más cercano al día de la colección de la muestra.<sup>27</sup>

Se deben seguir las instrucciones del fabricante para la colecta y el manejo de las muestras. Para los laboratorios en que las muestras anormales sean poco frecuentes puede ser necesario almacenarlos hasta que haya suficiente número para el experimento.<sup>14</sup>

No se deben utilizar muestras que rebasen el intervalo reportable y se deben eliminar muestras en las que se haya identificado la presencia de interferencias.<sup>14, 27</sup>

Si no se tienen muestras para todo el intervalo analítico entonces la conclusión será solo aplicable para el intervalo probado.<sup>27</sup>

***Nota:** Los procedimientos de control de calidad interno deben estar corriéndose en ambos métodos.*

### Duplicado de las mediciones

Las mediciones deben realizarse por duplicado, estos duplicados deben ser realizados colocando la muestra en diferentes copas, para que sean analizadas en diferentes corridas (en tiempos diferentes y/o en portamuestras diferentes), o al menos en diferente orden (evitar la corrida de la misma copa) y por tanto una determinación seguida de la otra.<sup>27</sup>

Las réplicas proveen confianza sobre los resultados de las mediciones y ayudan a identificar problemas de confusión de muestras, errores de transposición y otros errores, como burbujas en una de las muestras etc.



La diferencia en datos proporciona la oportunidad de identificar rápidamente una discrepancia en la ejecución del método, o bien la posibilidad de desechar el dato por tratarse de un valor aberrante.<sup>27</sup>

### Periodo de tiempo

Un mínimo de 5 días es requerido para hacer el experimento, aunque un número de días recomendables podrían ser 20 días.

Si se piensa en el número mínimo de muestras esto representa 4 muestras en 5 días o una muestra diaria por 20 días.<sup>27</sup>

Si se decide usar 40 muestras entonces serán 8 muestras por día.

Se recomienda que las muestras sean analizadas dentro de un periodo máximo de 2 horas entre un método y el otro, y si se hace simultáneamente es mejor.<sup>27</sup>

Cuando se corran las muestras que han estado refrigeradas o congeladas estas se deben correr en un periodo de una a dos horas después de haber sido atemperadas.<sup>14</sup>

### Datos necesarios para el experimento

Se deberá llenar una tabla con los siguientes datos y cálculos estadísticos:<sup>14</sup>

| Día | Número de muestra | Resultado método de prueba | Resultado método de comparación | $bi$ | $bi - \bar{b}$ | $(bi - \bar{b})^2$ | $\%bi$ | $\%bi - \overline{\%b}$ | $(\%bi - \overline{\%b})^2$ |
|-----|-------------------|----------------------------|---------------------------------|------|----------------|--------------------|--------|-------------------------|-----------------------------|
|     |                   |                            |                                 |      |                |                    |        |                         |                             |
|     |                   |                            |                                 |      |                |                    |        |                         |                             |
|     |                   |                            |                                 |      |                |                    |        |                         |                             |

Donde:

$bi$  = (resultado del método de prueba – resultado del método de comparación) o sesgo individual de la muestra en unidades convencionales.

$\%bi$  = [(resultado del método de prueba – resultado del método de comparación) / (resultado del método de comparación)] x 100 o porcentaje del sesgo individual de la muestra.

$\overline{\%b}$  = sesgo en porcentaje

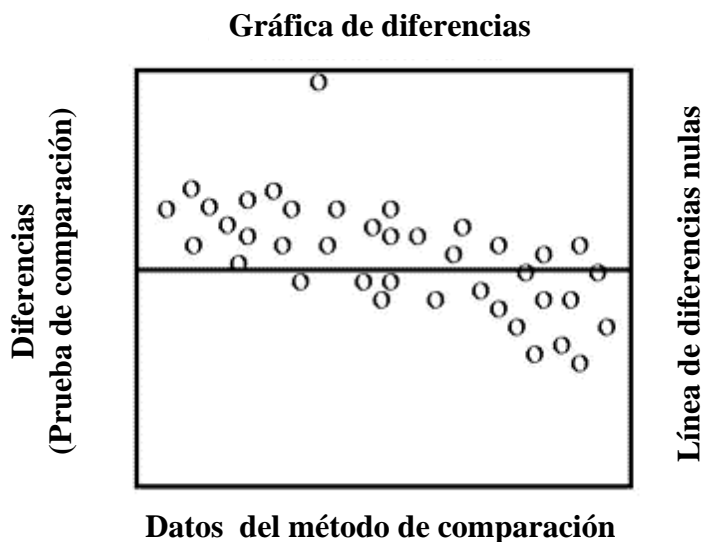
#### 7.3.1.2.2 Evaluación y criterio de aceptabilidad

Calcular la diferencia (o sesgo individual de la muestra) en unidades convencionales de reporte y/o el porcentaje de la diferencia (porcentaje del sesgo individual de la muestra) entre los resultados de cada muestra para los dos métodos.<sup>14</sup>

El análisis de datos más elemental consiste en graficar y comparar los datos idealmente, al tiempo que los datos son colectados con el objeto de identificar

discrepancias entre el método de prueba y el método de comparación, si hubiera diferencias se debe reanalizar para confirmar que esa diferencia es real y no un error de confusión con las muestras.<sup>27</sup>

Se espera que los dos métodos presenten una relación uno a uno de los datos obtenidos por lo que un gráfico de la diferencia de los valores de los métodos es recomendable, esto es, se grafica  $bi$  o también se puede usar  $\%bi$ , aunque lo más común es el primero, la diferencia de los valores del método de prueba menos los valores del método de comparación los cuales se colocan en el eje y, mientras los valores del método de comparación sobre el eje x, como se muestra en la figura siguiente.<sup>14,27</sup>



Los valores deben aparecer cerca de la “línea de diferencias nulas”, aproximadamente en la misma proporción por encima y por debajo de la línea.

El promedio de las diferencias es el sesgo o desviación, el cual se expresa en unidades convencionales, éste representa la diferencia promedio entre los métodos y se obtiene de la siguiente manera.<sup>27</sup>

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

De manera similar se obtiene el sesgo o desviación en porcentaje:

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

**Ambos valores se deberán comparar con los del fabricante:**

Si el sesgo estimado  $\bar{b}$  es menor que el reportado por el fabricante  $\beta$  entonces el usuario habrá encontrado consistencia con lo declarado por el fabricante. Esto también es válido para el  $\overline{\%b}$ .<sup>14</sup>

Si  $\bar{b} < \beta$  se concluye que el método es aceptable

Si lo anterior sucede entonces ya no es necesario calcular lo siguiente:

$$bi - \bar{b}, (bi - \bar{b})^2, \%bi - \overline{\%b} \text{ y } (\%bi - \overline{\%b})^2$$

Pero si  $\bar{b} > \beta$ , se concluye que el método no cumple con lo declarado por el fabricante por lo que, para aceptar el método habrá que demostrar que el valor de  $\bar{b}$  no es significativamente más grande o realmente diferente de  $\beta$  y entonces sí se deberán calcular  $bi - \bar{b}, (bi - \bar{b})^2, \%bi - \overline{\%b} \text{ y } (\%bi - \overline{\%b})^2$ , para obtener la desviación estándar de  $\bar{b}$  y  $\overline{\%b}$ , la cual se calcula de la siguiente manera:<sup>14</sup>

$$S_{\bar{b}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (bi - \bar{b})^2}{n-1}} \quad \text{y} \quad S_{\overline{\%b}} = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^l (\%bi - \overline{\%b})^2}{n-1}}$$

Los valores obtenidos permiten saber si hay diferencia estadística significativa o no entre  $\bar{b}$  y  $\beta$ .

Si algún usuario desea demostrar esto, se le sugiere lo siguiente:

- Verificar que el sesgo o desviación o el porcentaje de sesgo son constantes a través del intervalo analítico ya que este procedimiento solo puede ser aplicado cuando el sesgo es constante.<sup>14</sup>
- Asumir un porcentaje de falso rechazo  $\alpha$ . Típicamente los valores seleccionados para este porcentaje de error  $\alpha$ , son: 1% y 5%.
- Determinar un valor de t con el punto porcentual  $(100-\alpha)$ , de la distribución t con n-1 grados de libertad. Donde n representa el número de muestras de pacientes. Por ejemplo si  $\alpha = 1\%$  y  $n = 20$ , el punto  $(100-\alpha)$  de la distribución t con 19 grados de libertad es 2,539 que se puede obtener en las tablas de t de cualquier texto de estadística.<sup>14</sup>
- Calcular el valor de verificación para el sesgo en unidades convencionales el cual está dado por la ecuación:

$$\text{Valor de verificación para } \bar{b} = \frac{t S \bar{b}}{\sqrt{n}} + \beta$$

Donde:

t= valor de t calculado en tablas

$S\bar{b}$  = desviación estándar del sesgo

n= Número de muestras

$\beta$ = sesgo declarado por el fabricante

- Concluir con base en lo siguiente:

Si el sesgo  $\bar{b}$  estimado es menor que el valor de verificación, el usuario ha demostrado que él  $\bar{b}$  es consistente con el sesgo  $\beta$  declarado por el fabricante.

Por el contrario si el sesgo  $\bar{b}$  estimado es mayor que el valor de verificación, el laboratorio usuario ha demostrado que él  $\bar{b}$  es inconsistente con el sesgo  $\beta$  declarado por el fabricante

Si el porcentaje de sesgo es utilizado, entonces se debe calcular el valor de verificación para el porcentaje de sesgo como:

$$\text{Valor de verificación para } \overline{\%b} = \frac{t S \overline{\%b}}{\sqrt{n}} + \beta$$

Si  $\overline{\%b}$  estimado es menor que el valor de verificación, el laboratorio usuario ha demostrado que el  $\overline{\%b}$  es consistente con el sesgo  $\beta$  en porcentaje, declarado por el fabricante.

Por el contrario si  $\overline{\%b}$  estimado es mayor que el valor de verificación el laboratorio usuario ha demostrado que él  $\overline{\%b}$  es inconsistente con el sesgo  $\beta$  en porcentaje, declarado por el fabricante.<sup>14</sup>

Esta comparación de métodos es útil cuando el laboratorio quiere demostrar que el método cumple con lo declarado por el fabricante. Si el método es nuevo y se va a implementar en el laboratorio entonces se sugiere aplicar el procedimiento de la guía NCCLS document EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples.<sup>14</sup>

### 7.3.1.3 Estudios de comparación interlaboratorio con base en los resultados de los programas de ensayos de aptitud

**Nota:** Un tipo de programa de ensayos de aptitud mediante comparaciones interlaboratorios son comúnmente conocidos en el área clínica como Programas de Evaluación Externa de la Calidad (PEEC).

Los materiales utilizados (suero, plasma, liofilizados etc.) con un valor asignado por consenso en los programas de ensayos de aptitud pueden ser utilizados para la determinación de la veracidad o de la exactitud de medición. En este caso la demostración de la veracidad o de la exactitud de medición se limita a la confirmación por el método de prueba de que este se desempeña de manera similar al mismo método en otros laboratorios.<sup>14</sup>

Si un programa de ensayos de aptitud existe para un analito dado, los resultados se deben interpretar usando los criterios de aceptación del organizador.<sup>14</sup>

Dado que muchos procedimientos analíticos han sido implantados con meses o años de antelación estos se consideran procedimientos históricos dentro del laboratorio y por lo tanto es preferible una verificación interlaboratorio de la veracidad, que una comparación de métodos.

Por otra parte cuando se pretende implementar un nuevo método en el laboratorio, no puede hacerse con base en los resultados de programas de ensayos de aptitud, si no que en este caso se sugiere aplicar el procedimiento de la guía NCCLS document EP9-A2 Method comparison and bias estimation using patient samples.<sup>14, 27</sup>

El criterio de aceptabilidad para los procedimientos de examen que los laboratorios clínicos van a acreditar deben demostrar consistencia en al menos los últimos seis meses en la participación y en los resultados de programas de ensayos de aptitud.

Si las evaluaciones en los programas de ensayos de aptitud fueran por bimestre, trimestre o cuatrimestre, entonces se debe demostrar consistencia en, al menos los últimos doce meses tanto en la participación como en los resultados de programas de ensayos de aptitud.

Los resultados expresados en índice de desviación no serán en promedio mayores de 1,0 y los resultados expresados en puntuación del índice de varianza no serán en promedio mayores a 100%, considerando en ambos indicadores valores absolutos. Lo anterior deberá ser corroborado por el experto técnico al evaluar el proceso.

Es requisito indispensable que el analito a acreditar se pruebe en, por lo menos, dos de los tres niveles de concentración (baja, media y alta) del intervalo de medición del método. Lo más conveniente es probar con tres niveles de concentración. Así mismo, sería óptimo contar con valores de exactitud de *medición* o veracidad correspondientes a niveles de decisión clínica.

## 7.4 Incertidumbre

La utilización de procedimientos de examen adecuados para el propósito, permite obtener resultados trazables con un nivel apropiado de incertidumbre. La trazabilidad del resultado de medición obtenido con los procedimientos de examen cuantitativos pueden agruparse de acuerdo a lo establecido por el Joint Commite for Trazability on Laboratory Medicine (JCTLM) en aquellos cuyo resultado de medición es trazable a materiales de referencia certificados trazables a unidades del sistema internacional (SI) o a métodos de referencia a unidades de consenso aceptados por acuerdo internacional.

Al realizar la validación o verificación de un método debe incluirse la estimación de la incertidumbre. La estimación de la incertidumbre del resultado final de medición deberá considerar las contribuciones de incertidumbre significativas y que no se encuentren incluidas en el diseño de la validación. Por ejemplo, preparación del paciente, muestreo, tipo de matriz, preparación de la muestra, entre otras.<sup>25</sup>

La política de incertidumbre de la ema en el punto 5.3.2.2 establece:

Como una consecuencia del uso de la incertidumbre en el área clínica, y donde sea aplicable una declaración de ésta, se deberá estimar de acuerdo a cualquiera de los siguientes casos:

- a) Cuando el método de medición se haya validado dentro del laboratorio.
- b) Cuando existan datos provenientes de mediciones de control de calidad interno.
- c) Pruebas interlaboratorio para determinar los parámetros de desempeño del método de acuerdo a la NMX-5725-3-IMNC.

Cuando se requiera para soportar la validez o aplicación del resultado de ensayo, cuando exista una solicitud expresa del cliente, o cuando la incertidumbre afecte el cumplimiento de una especificación.

Cuando en los procedimientos de medición del área clínica se dificulte el cálculo de la incertidumbre componente por componente, el laboratorio debe por lo menos, intentar identificar a todos los componentes de la incertidumbre y hacer una estimación que permita una interpretación adecuada de la misma.

Para la estimación de la incertidumbre, el laboratorio procederá de la siguiente manera, según sea el caso:

Caso a, se deberán considerar por lo menos la incertidumbre proveniente del material de referencia (calibrador, ajustador, material de referencia certificado) y la incertidumbre de la medición (datos de repetibilidad, datos del control diario, precisión intermedia).

Caso b, si se cuenta con los datos de las mediciones de control de calidad interno se debe proceder como en el caso a y si no se cuenta con información de la concentración y la incertidumbre del material de calibración se debe considerar

únicamente la contribución de la incertidumbre de la medición. Por ejemplo cuando se utilizan calibradores electrónicos o ajustadores fotométricos.

Caso c, en los programas formales de comparación interlaboratorio, es común que el organizador, informe un valor de índice de desviación (ID) o una puntuación del índice de varianza (PIV), este dato será empleado para calcular el error cuadrático medio (ECM) que corresponde al valor de la incertidumbre de la medición.

En caso de no existir dichos programas, el intercambio de muestras con otros laboratorios será válido.

En esta guía se considera para la estimación de la incertidumbre lo propuesto en los incisos a y b, no obstante, los laboratorios deberán continuamente identificar y evaluar la contribución de otras fuentes de incertidumbre, tales como: la variabilidad de la fase pre-examen, variabilidad en la preparación o reconstitución de los calibradores, falta de conmutabilidad de los calibradores, inadecuación de la función de calibración, interferencias y el redondeo de los resultados, entre otras.<sup>3</sup>

## 8 BIBLIOGRAFÍA

1. Castillo M. L., Fonseca M. E., Mejoría Continua de la Calidad. Glosario. 1ra edición. Editorial Médica Panamericana, pp 297 – 314, 1995.
2. Douglas C. Montgomery. Control Estadístico de la Calidad, Grupo Editorial Iberoamericana, 1991.
3. Fuentes Arderiu, X, Sánchez Manrique, M. Guía para estimar la incertidumbre de medida en ciencias de laboratorio clínico. Bioquímica. Octubre-Diciembre 2002.
4. Fuentes-Arderiu, X. Recomendaciones para la preparación de los informes de laboratorio clínico, Artículo para el Consejo Técnico de la Sociedad Española de Bioquímica Clínica y Patología Molecular, 2005.
5. Gella F. Javier. Control de calidad. Monografía. Barcelona: BioSystems. 2005.
6. Gella F. Javier. Metrología en el laboratorio clínico. Monografía. Barcelona: BioSystems. 2005.
7. Guder WG, Narayanan S, Wisser H, Zawta B. Muestras: del paciente al laboratorio. Impacto de las variables preanalíticas sobre la calidad de los resultados de laboratorio, CD-ROM. Madrid: Becton Dickinson; 1999.
8. Harmonized guidelines for single-laboratory validation of methods of analysis. Pure appl. Chem., vol. 74, nº 5, pp.835-855, 2002.

9. ISO guide 30. Terms and definitions used in connection with reference materials. 1992.
10. Métodos analíticos adecuados a su propósito. Traducción libre. Centro Nacional de Metrología. 1998
11. Miller N. James, Miller C. Janes, Estadística y Quimiometría para Química Analítica, Editorial Prentice Hall, 4ª Edición, 2002.
12. MP-CA005-00 Manual de procedimiento. Incertidumbre de mediciones. Política. Entidad Mexicana de Acreditación, A.C. 2007
13. NCCLS Document EP15-A; User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy; Approved Guideline. 2001.
14. NCCLS. Document EP6-A: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. 2003
15. NMX-CC-9000-IMNC-2000. Sistemas de gestión de la calidad. Fundamentos y vocabulario.
16. NMX-CH-140-INMC-2002. Guía para la expresión de incertidumbre en las mediciones.
17. NMX-CH-152-IMNC-2005. Metrología en Química-Vocabulario.
18. NMX-CH-5725-1-IMNC-2006. Exactitud (veracidad y precisión) de resultados y métodos de medición, parte 1: Principios generales y definiciones. 1ª. Edición, 2006.
19. NMX-EC-15189-IMNC-2006 Administración de calidad en el laboratorio clínico.
20. NMX-EC-43/1-INMC-2000 Ensayos de aptitud por comparaciones interlaboratorios. Parte 1 – Desarrollo y funcionamiento de programas de ensayos de aptitud.
21. NMX-Z-055-1997-IMNC, Metrología vocabulario de términos fundamentales y generales.
22. NOM-177-SSA1-1998, Que establece las pruebas y procedimientos para demostrar que un medicamento es intercambiable. Requisitos a que deben sujetarse los terceros autorizados que realicen las pruebas.
23. Oficina de Acreditación Guatemala. Política de selección y validación de métodos de ensayo. Oct 2005
24. Organismo Argentino de Acreditación. Guía para validación de métodos de ensayo. Septiembre 2003.



25. Pérez-Castorena, A, Guevara-Hernández, A, Calculo de la incertidumbre asociada al resultado de la medición de glucosa, Bioquímica, 107: 32-40; 2002.
26. Swartz, M., Krull, I.S. 1997. Analytical method development and validation.
27. Westgard O. James. Basic Method Validation. 2<sup>nd</sup>. Edition. 2003 pp.29-30, 87-99, 111-122.

## 9 MATERIAL DE LECTURA ADICIONAL.

- NCCLS document EP5-A2: Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved-Second Edition. (2004)
- NCCLS document EP6-A: Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guideline. (2003)
- NCCLS document EP7-A: Interference Testing in Clinical Chemistry; Approved Guideline (2002)
- NCCLS document EP9-A2 : Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples; Approved Guideline - Second Edition (2002)
- NCCLS document EP10-A2: Preliminary Evaluation of Quantitative Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline - Second Edition (2002)
- NCCLS document EP12-A: User Protocol for Evaluation of Qualitative Test Performance; Approved Guideline (2002)
- NCCLS document EP14-A : Evaluation of Matrix Effects; Approved Guideline (2001)
- NCCLS document EP15-A : User Demonstration of Performance for Precision and Accuracy; Approved Guideline (2001)
- NCCLS document EP17-A: Protocols for Determination of Limits of Detection and Limits of Quantitation; Approved Guideline.
- NCCLS document EP21-A : Estimation of Total Analytical Error for Clinical Laboratory Methods; Approved Guideline (2003)

**Nota aclaratoria:** El National Committee for Clinical Laboratory Standards denominado hasta el 2004 fue conocido como NCCLS, actualmente es Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI).

## ANEXO EJEMPLOS PARA LA EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE VERIFICACIÓN

### 1. - Ejemplo de Evaluación de la linealidad

Suponer que se va a evaluar la linealidad de un método analítico para la determinación de colesterol, el fabricante del equipo menciona que el método es lineal en el intervalo de 40 a 430 mg/dL.

Por lo tanto lo primero que se debe hacer es buscar controles o muestras muy cercanas a estos límites, de preferencia por abajo del menor y por arriba del superior, sin embargo esto último no debe ser considerado un requisito o una limitante.

Primero se decidirá si se hace con calibradores, con sueros control o con muestras; únicamente si no se pueden tener calibradores ni sueros control se optará por utilizar muestras de pacientes.

#### 1.1 - Ejemplo de evaluación de la linealidad utilizando muestras

Suponer que la determinación de colesterol se realiza en la misma fecha y en el mismo equipo con dos muestras, una de concentración igual a 50 mg/dL y otra de 410 mg/dL.

Nótese que la primera muestra es mayor en concentración que el límite inferior y la segunda muestra tiene una concentración menor que el límite superior reportado por el fabricante.

Por lo que el usuario de esta guía podría preguntarse ¿podría usar un par de muestras de 80 mg/dL y 320 mg/dL, o quizás de 160 y 400 mg/dL?

La respuesta en ambos casos es sí, pero la linealidad del método solo será válida para el intervalo seleccionado.<sup>27</sup> Al seleccionar el intervalo de verificación para la linealidad, se deben considerar los siguientes criterios:

Si se tiene el intervalo teórico, el intervalo probado debe ser al menos 2/3 del teórico pero además incluyendo puntos de decisión clínica.

Si no se tiene el intervalo teórico entonces el experto técnico deberá aplicar su criterio, ya que si un laboratorio evalúa la linealidad en un intervalo muy pequeño, por ejemplo de 150 a 250 mg/dL, el resultado sería poco representativo y por lo tanto el ejercicio sería inadmisibile.

Suponer que se designa a la muestra de 50 mg/dL como muestra 1 y a la de 410 mg/dL como muestra 2 y que se preparan diluciones, de acuerdo a la tabla 1.

Tabla 1. Preparación de diluciones

| Número de dilución | Porción en volumen de la muestra 1 | Porción en volumen de la muestra 2 |
|--------------------|------------------------------------|------------------------------------|
| 1                  | Usar sin diluir                    | 0                                  |
| 2                  | 3                                  | 1                                  |
| 3                  | 2                                  | 2                                  |
| 4                  | 1                                  | 3                                  |
| 5                  | 0                                  | Usar sin diluir                    |

Por lo general se realizan al menos tres mediciones de cada dilución y se tabulan los datos (supuestos) como en la tabla siguiente.

Tabla 2. Obtención de las medias de concentración de las respectivas diluciones

| Dilución | Preparación de la dilución  | Mediciones de concentración o actividad |     |     | Media |
|----------|---|---|-----|-----|-------|
|          |   | 1                                       | 2   | 3   |       |
| 1        | No se requiere preparación ( $M_1$ ) (usar valores muy bajos o cercanos a cero en concentración)                  | 47                                      | 49  | 48  | 48    |
| 2        | Tres partes de $M_1$ y una $M_2$  | 135                                     | 135 | 137 | 135,6 |
| 3        | Dos partes de $M_1$ y dos partes de $M_2$   | 230                                     | 233 | 236 | 233   |
| 4        | Una parte de $M_1$ y tres partes de $M_2$   | 330                                     | 322 | 329 | 327   |
| 5        | No se requiere preparación ( $M_2$ ) (usar muestra con valor de concentración cercano al tope del ámbito lineal). | 401                                     | 407 | 399 | 402,3 |

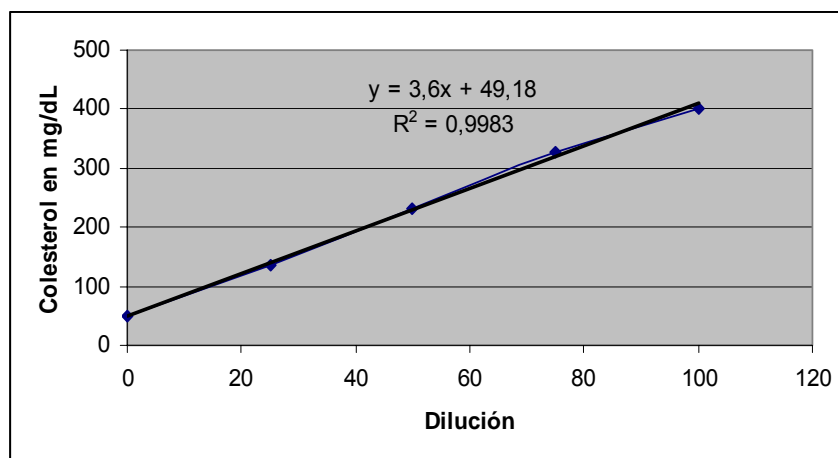
Se grafica la media de las replicas sobre el eje Y, contra el valor conocido (calibradores) o asignado (sueros control o muestras) sobre el eje X. <sup>14, 27</sup>

Con los datos de la media de las muestras, tabla 3, se grafican las coordenadas de los puntos (0%, media de la dilución 1), (25%, media de la dilución 2), (50%, media de la dilución 3), (75%, media de la dilución 4), (100%, media de la dilución 5).

Tabla 3. Linealidad utilizando muestras

| Dilución %<br>(M <sub>2</sub> ) | Media de la<br>concentración<br>(md/dL) |
|---------------------------------|---|
| 0                               | 48                                      |
| 25                              | 135,6                                   |
| 50                              | 233                                     |
| 75                              | 327                                     |
| 100                             | 402,3                                   |

Usando el método de mínimos cuadrados, se calculó la ecuación de la recta de regresión para los puntos dados y el coeficiente de determinación.



El valor  $r^2$ , 0,9983 del coeficiente de determinación indica la proporción de la varianza de y que puede atribuirse a la varianza de X.

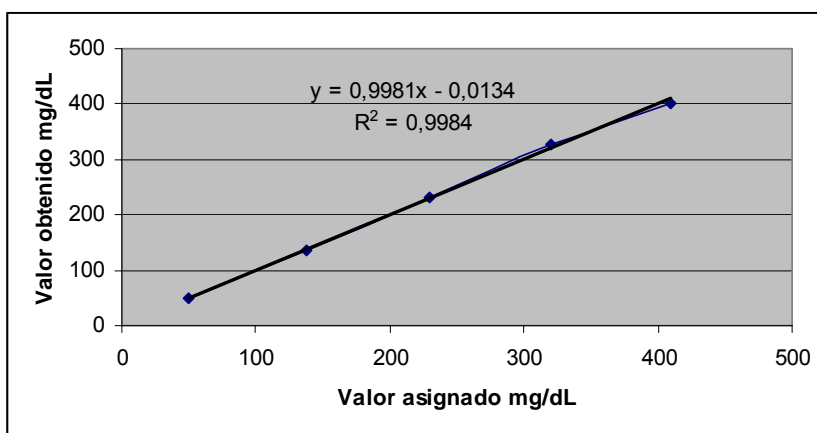
## 1.2 - Ejemplo de evaluación de la linealidad utilizando calibradores

Si, para evaluar la linealidad, en vez de muestras se utilizan calibradores de concentración conocida, la tabla de datos (supuestos), puede ser la siguiente:

Tabla 4. Linealidad utilizando calibradores

| Valor asignado<br>(mg/dL) | Valor de la media<br>de los<br>calibradores<br>(mg/dL) |
|---------------------------|--|
| 50                        | 48   |
| 138,2                     | 135,6  |
| 230                       | 233  |
| 320                       | 327  |
| 410                       | 402,3  |

Estos datos se grafican y la curva resultante corregida por el método de mínimos cuadrados resulta lineal con una pendiente de 0,9981 y su intercepto de - 0,0134. (La pendiente deseable es de 1,00 y la ordenada al origen de 0).



El valor  $r^2$  0,9984 del coeficiente de determinación indica que en el intervalo evaluado, la función de calibración es lineal, sin embargo esto no es suficiente, se deben obtener también las desviaciones y para ello se completa la Tabla 5.

Tabla. 5 Validación del intervalo reportable

| Número de dilución | Media, valores prácticos Y | Valor teórico X | Sesgo (sesgo) | % Error |
|--------------------|----------------------------|-----------------|---------------|---------|
| 1                  | 48                         | 50              | -2            | -4,0%   |
| 2                  | 135,6                      | 138,2           | -2,6          | -1,88%  |
| 3                  | 233                        | 230             | 3             | 1,3%    |
| 4                  | 327                        | 320             | 7             | 3,0%    |
| 5                  | 402,3                      | 410             | -7,7          | -1,87%  |

Finalmente, se compara el sesgo (desviación) o el porcentaje de error para cada dilución con el error permitido para la prueba, de acuerdo con la información del fabricante o del método, donde el sesgo (desviación) y % de error debe ser menor que el error permitido y a partir de esta comparación se toma la decisión de aceptabilidad o rechazo.

## 2. - Ejemplo de la precisión obtenida en el laboratorio

Suponer que se ha determinado colesterol utilizando un suero control y que se han realizado 20 determinaciones en el transcurso del día y sus resultados fueron:

Tabla. 6 Resultados intradía de un suero control

| Nº de lecturas | Colesterol en mg/dL |
|----------------|---------------------|
| 1              | 204                 |
| 2              | 200                 |
| 3              | 198                 |
| 4              | 201                 |
| 5              | 203                 |
| 6              | 200                 |
| 7              | 199                 |
| 8              | 198                 |
| 9              | 202                 |
| 10             | 206                 |
| 11             | 197                 |
| 12             | 202                 |
| 13             | 206                 |
| 14             | 200                 |
| 15             | 197                 |
| 16             | 198                 |
| 17             | 200                 |
| 18             | 200                 |
| 19             | 205                 |
| 20             | 208                 |

De los datos se obtienen la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación, para posteriormente aplicarle el criterio de aceptabilidad.

Media = 201,2

DE = 3,14

CV= 1,56%

De acuerdo a los criterios de aceptabilidad de CLIA para imprecisión intraserial o intradía, la desviación estándar obtenida debe ser igual o menor a  $\frac{1}{4}$  del error total permitido.<sup>27</sup> Para colesterol el error total permitido  $\pm 10\%$

Esto es: DE intraserial o DE intradía  $\leq 0,25$  ET (error total permitido)

Sustituyendo el valor para colesterol se tiene: DE intradia  $\leq 0,25$  (10%)

De ahí que al comparar el valor de CV obtenido en el ejemplo vs el criterio de aceptación, resulta que es menor.

$$1,56\% \leq 2,5\%$$

Por lo que se concluye que la imprecisión del método de colesterol es aceptable.

Cabe mencionar, que aquí podrían usarse 20 valores del control interno del colesterol y aplicar el criterio para la DE interserial  $\leq 0,33$  ET (error total permitido).

### 3. - Ejemplos para verificar la veracidad

#### 3.1 - Ejemplo para determinar la veracidad de un método analítico utilizando el cálculo del error relativo

Se desea determinar el error relativo del método utilizado para la cuantificación de la concentración de leucocitos (WBC) en un contador de células por citometría de flujo. Para ello se emplea un material de referencia que indica una concentración de  $9,7 \pm 1 \times 10^3$  células /  $\mu\text{L}$ . Después de la calibración adecuada del equipo, se realizan 10 lecturas del material de referencia y se calculan la media, la desviación estándar y el coeficiente de variación, obteniendo los siguientes resultados:

Tabla. 7

| No. de lecturas | Concentración WBC x $10^3$ cel / $\mu\text{L}$ . |
|-----------------|--|
| 1               | 9,8  |
| 2               | 9,8  |
| 3               | 9,5  |
| 4               | 9,7  |
| 5               | 9,8  |
| 6               | 9,8  |
| 7               | 9,8  |
| 8               | 9,5  |
| 9               | 9,7  |
| 10              | 9,8  |

|              |      |
|--------------|------|
| <b>Media</b> | 9,71 |
| <b>DE</b>    | 0,12 |
| <b>% CV</b>  | 1,26 |

Determinación del error relativo:

$$\% \text{ Error Relativo} = ((\text{Valor real} - \text{Valor media}) / \text{Valor real}) \times 100$$

Se sustituyen los valores en la fórmula:

$$\% \text{ Error Relativo} = ((9,70 - 9,71) / 9,70) \times 100 = -0,1989 \%$$

Interpretación de los resultados:

En este caso el % error relativo es igual a -0,1989 %

El criterio de aceptabilidad es que el valor sea menor o igual al reportado por el fabricante del instrumento, si el fabricante ha reportado un valor de  $\pm 2 \%$ , se concluye que la veracidad del método es aceptable.

Ya que entre menor sea el porcentaje de error relativo mayor será la veracidad del método.



Y como podrá notarse, la desviación estándar y el coeficiente de variación no se usan en los cálculos, sin embargo, son importantes dado que podríamos tener datos como los siguientes:

Tabla. 8

| No. de lecturas | Concentración WBC x 10 <sup>3</sup> cel / µL |
|-----------------|--|
| 1               | 8,9  |
| 2               | 9,1  |
| 3               | 9,5  |
| 4               | 9,7  |
| 5               | 9,4  |
| 6               | 9,9  |
| 7               | 10,2   |
| 8               | 9,5  |
| 9               | 10,5   |
| 10              | 10,3   |

|              |      |
|--------------|------|
| <b>Media</b> | 9,7  |
| <b>DE</b>    | 0,52 |
| <b>% CV</b>  | 5,38 |

Donde el valor de la media es prácticamente el mismo que el valor esperado, pero aquí el coeficiente de variación es muy grande y si consideramos que el porcentaje del coeficiente de variación reportado por el fabricante es de 4%, entonces el método debe descartarse para WBC.

**Nota.** Cuando se realicen experimentos de veracidad es muy conveniente corroborar que también se cumple con criterios de precisión.

En este ejemplo la desviación estándar es igual a 0,52. Esta información es útil para estimar la incertidumbre del valor promedio, de manera que la decisión sobre la veracidad del método analítico se realiza sobre una base teórica más robusta.

### 3.2 Ejemplo para determinar la veracidad de un método analítico por medio del porcentaje de recuperación

Se desea determinar la veracidad de la cuantificación de la concentración de la glucosa por el método de GOD-PAP en un equipo automatizado.

Se emplea un suero control con un valor conocido de 106 mg / dL (5,8 mmol / L).

Metodología:

Después de realizar la calibración como lo indica el fabricante del equipo automatizado, se realizan 10 lecturas del suero control y se obtienen los siguientes datos:

Tabla. 9 Resultados glucosa en suero control

| N ° de Lecturas | Concentración mg/dL |
|-----------------|---------------------|
| 1               | 111                 |
| 2               | 102                 |
| 3               | 111                 |
| 4               | 107                 |
| 5               | 113                 |
| 6               | 110                 |
| 7               | 109                 |
| 8               | 112                 |
| 9               | 109                 |
| 10              | 111                 |

|              |        |
|--------------|--------|
| <b>Media</b> | 109,45 |
| <b>DE</b>    | 3,13   |
| <b>% CV</b>  | 2,86   |

Determinación del % de Recuperación:

$$\% \text{ de Recuperación} = (\text{Valor obtenido} / \text{Valor verdadero}) \times 100$$

Se sustituyen los valores en la fórmula:

$$\% \text{ de Recuperación} = (109,45 / 106,00) \times 100 = 103,2 \%$$

Interpretación de los resultados:

En este caso el % de Recuperación es igual a 103,2 % lo que indica que la recuperación es mayor a un 3 % del mensurando.

Si se considera el criterio de que el porcentaje permitido de recuperación o la media del porcentaje de recuperación varíe de 98% a 102%, se concluye que el método analítico no es aceptable ya que el % de recuperación está fuera del intervalo establecido.

El criterio anterior, no siempre se cumple en todos los sistemas analíticos ni para todos los analitos, por lo que un segundo criterio es que el valor sea menor o igual al reportado por el fabricante del instrumento.

Si el fabricante proporciona un porcentaje de recuperación de  $100 \pm 4\%$ , entonces el valor de 103,2 % sería aceptado.

### 3.3 Ejemplo para determinar la veracidad de un método de prueba por medio de la comparación contra un método aceptado

Considere un experimento para la comparación de dos métodos analíticos utilizados para la determinación de colesterol total en el laboratorio. El método de prueba es el que se desea verificar si cumple con las especificaciones de veracidad del fabricante, y el método de comparación es el usado por otro laboratorio (por ej. el laboratorio subcontratado).

Se analizan por 5 días, 4 muestras en el intervalo de 50 a 303 mg/dL de colesterol, esto cubre casi todo el intervalo analítico incluyendo valores cercanos a puntos de decisión clínica, como 200 mg/dL.<sup>27</sup>

Los resultados y cálculos asociados se dan en la tabla 10.

Tabla. 10 Resultados de la comparación entre los dos métodos

| Día       | Muestra | Resultado método de prueba | Resultado método de comparación | $b_i$ | $b_i - \bar{b}$ | $(b_i - \bar{b})^2$ | $\%b_i$ | $\%b_i - \overline{\%b}$ | $(\%b_i - \overline{\%b})^2$ |
|-----------|---------|----------------------------|---------------------------------|-------|-----------------|---------------------|---------|--------------------------|------------------------------|
| 1         | 1       | 60                         | 63                              | -3    | -5,16           | 26,63               | -4,76   | -6,93                    | 48,05                        |
|           | 2       | 206                        | 200                             | 6     | 3,84            | 14,75               | 3,00    | 0,83                     | 0,69                         |
|           | 3       | 158                        | 158,2                           | -0,2  | -2,36           | 5,57                | -0,13   | -2,3                     | 5,27                         |
|           | 4       | 106                        | 102                             | 4     | 1,84            | 3,39                | 3,92    | 1,75                     | 3,07                         |
| 2         | 5       | 58                         | 50                              | 8     | 5,84            | 34,11               | 16,00   | 13,83                    | 191,27                       |
|           | 6       | 184                        | 179                             | 5     | 2,84            | 8,07                | 2,79    | 0,62                     | 0,39                         |
|           | 7       | 264                        | 259                             | 5     | 2,84            | 8,07                | 1,93    | -0,24                    | 0,06                         |
|           | 8       | 210                        | 212                             | -2    | -4,16           | 17,31               | -0,94   | -3,11                    | 9,69                         |
| 3         | 9       | 79                         | 71                              | 8     | 5,84            | 34,11               | 11,27   | 9,1                      | 82,77                        |
|           | 10      | 130                        | 131,6                           | -1,6  | -3,76           | 14,14               | -1,22   | -3,39                    | 11,46                        |
|           | 11      | 130                        | 129                             | 1     | -1,16           | 1,35                | 0,78    | -1,39                    | 1,95                         |
|           | 12      | 159                        | 164                             | -5    | -7,16           | 51,27               | -3,05   | -5,22                    | 27,24                        |
| 4         | 13      | 283                        | 277                             | 6     | 3,84            | 14,75               | 2,17    | 0,00                     | 0,00                         |
|           | 14      | 196                        | 201                             | -5    | -7,16           | 51,27               | -2,49   | -4,66                    | 21,69                        |
|           | 15      | 176                        | 169                             | 7     | 4,84            | 23,43               | 4,14    | 1,97                     | 3,89                         |
|           | 16      | 115                        | 120                             | -5    | -7,16           | 51,27               | -4,17   | -6,34                    | 40,15                        |
| 5         | 17      | 197                        | 198                             | -1    | -3,16           | 9,99                | -0,51   | -2,68                    | 7,16                         |
|           | 18      | 76                         | 70                              | 6     | 3,84            | 14,75               | 8,57    | 6,4                      | 40,98                        |
|           | 19      | 133                        | 127                             | 6     | 3,84            | 14,75               | 4,72    | 2,55                     | 6,53                         |
|           | 20      | 307                        | 303                             | 4     | 1,84            | 3,39                | 1,32    | -0,85                    | 0,72                         |
| Sumas     |         |                            |                                 | 43,2  |                 | 402,29              | 43,36   |                          | 503,02                       |
| $\bar{b}$ |         |                            |                                 | 2,16  |                 | $\overline{\%b}$    | 2,17    |                          |                              |

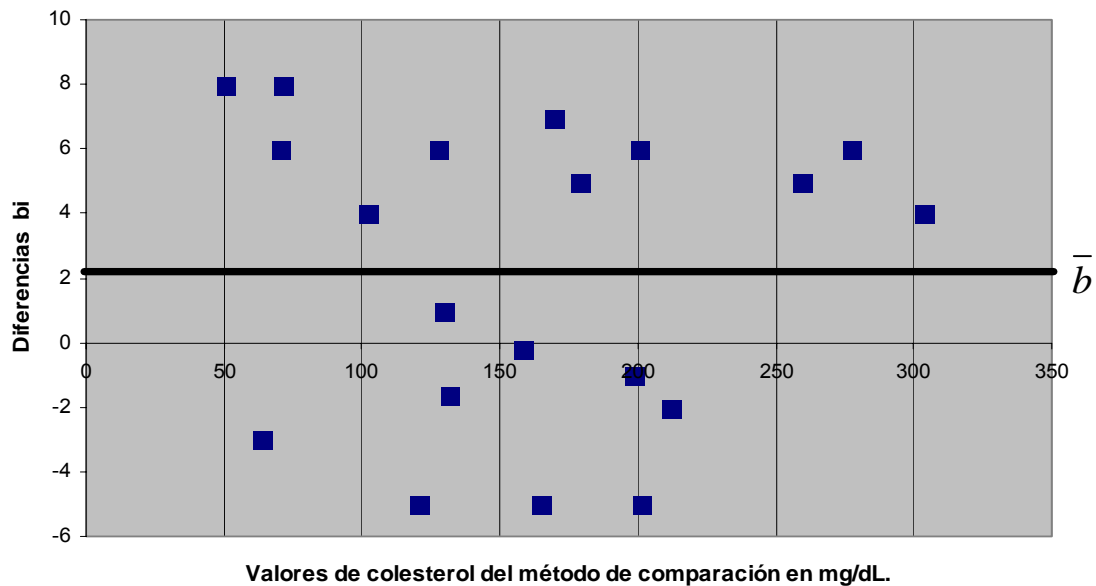
Primero se obtiene el valor de las diferencias (sesgo individual) resultado del método de prueba menos el resultado del método de comparación, dichos valores se suman y se obtiene un valor de 43,2 para  $b_i$  y de 43,36 para  $\%b_i$  con lo cual se aplica la ecuación para obtener el sesgo en unidades convencionales y en porcentaje.

$$\bar{b} = \frac{\sum_{i=1}^I b_i}{n} = \frac{43.2}{20} = 2.16 \text{ mg / dL}$$

$$\overline{\%b} = \frac{\sum_{i=1}^I \%bi}{n} = \frac{43.36}{20} = 2.17\%$$

Posteriormente, elaborar el gráfico de las diferencias, expresando en este el valor de  $\bar{b}$  si este estuviera en unidades convencionales o bien el de  $\overline{\%b}$  si el gráfico lo hubiésemos expresado en %.

**Gráfica de las diferencias de la comparación de métodos para colesterol total.**



Ahora si el sesgo  $\beta$  declarado por el fabricante es de 2,5 mg/dL y 2,7% respectivamente, entonces se tiene que:

$$\bar{b} < \beta \text{ o bien que } \overline{\%b} < \beta \text{ expresado en porcentaje.}$$

Otra forma es comparar en un gráfico, los datos del método de prueba (en el eje Y) y los datos del método de comparación (en el eje X).

Se traza la mejor recta mediante regresión lineal, con lo que se obtiene la pendiente y la intersección al origen:

$$Y = mX + b$$

Donde:

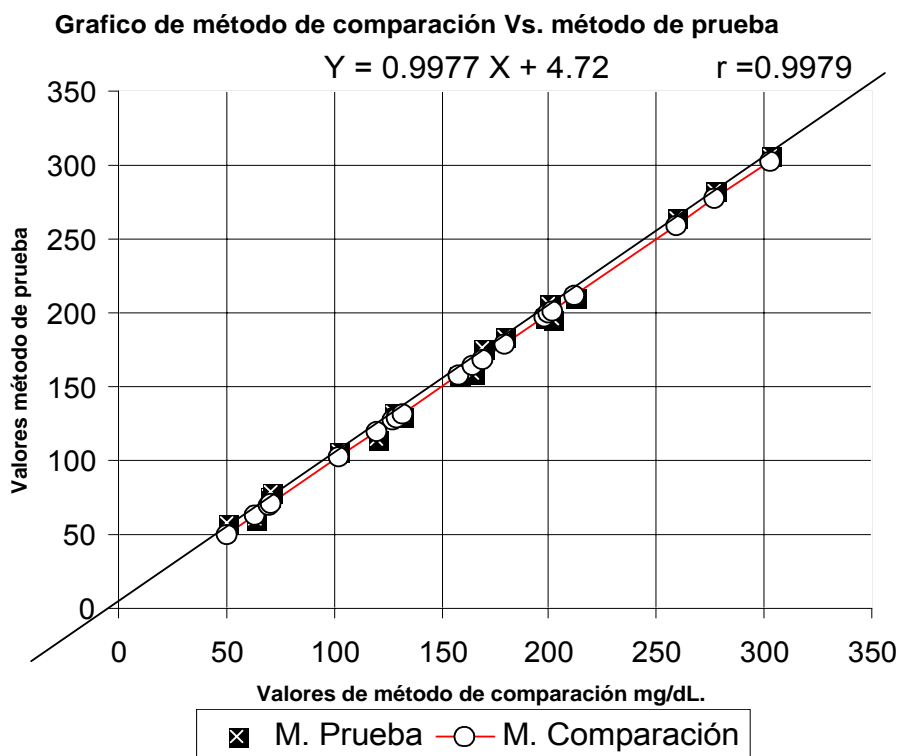
m = pendiente

b = intercepto en Y u ordenada al origen

X = valor del método de comparación

Y = valor del método de prueba

Para el caso de los datos de la tabla anterior se obtiene el gráfico y ecuación siguiente:



La ecuación permite obtener el error sistemático en los puntos de interés médico, de forma tal que sustituyendo X por el valor de 200 mg/dL se obtiene el valor para el método de prueba.

$$Y = (0,9977 \times 200) + 4,72 = 199,54 + 4,72 = 204,26 \text{ mg/dL}$$

Enseguida se procede a calcular el valor de desviación (sesgo) en los puntos de decisión clínica.<sup>21</sup>

$$Y \text{ calculado} - X \text{ punto de decisión clínica} = 204,26 - 200 = 4,26 \text{ mg/dL.}$$

Lo que significa que hay un error sistemático de 4,26 mg/dL y un  $\overline{\%b}$  de  $(4,26/200) \times 100 = 2,13 \%$  muy similar al obtenido por el método de las diferencias que fue de 2,17 %. Este valor, 2,13, también es inferior al 2,7% declarado por el fabricante, por lo que se confirma que el método es conforme con lo establecido por el fabricante.

### 3.4 Ejemplo para estimar la incertidumbre componente por componente

#### Medición de la concentración de masa de albúmina en la orina.<sup>3</sup>

La concentración de masa de albúmina en la orina se mide por un procedimiento inmunoturbidimétrico, con una suspensión de partículas de látex sensibilizadas con anticuerpos contra la albúmina humana como reactivo, y lecturas de absorbancia a 540 nm en dos momentos definidos; se cumple la ley de Lambert-Beer-Bouguer. La calibración se realiza con un material de referencia certificado SRM 927 del NIST. El resultado de la medición es:

Uri-albúmina; concentración de masa (SRM 927) = 7,0 mg/L

Partiendo del supuesto de que la variabilidad premetrológica fuese insignificante y aceptando que no actúan como causas de incertidumbre, ni la definición incompleta del componente en estudio, ni la falta de conmutabilidad del calibrador, ni las magnitudes influyentes, ni el redondeo de los resultados, los únicos componentes de la incertidumbre de esta medición serán los siguientes:

- Incertidumbre de *medición* del valor del calibrador. El valor asignado del calibrador es 69,3 mg/L y el fabricante declara que la incertidumbre expandida de este valor es 1,5 mg/L (con un intervalo de confianza del 95%). Como el factor de cobertura corresponde al nivel de confianza del 95% es 2, la incertidumbre típica relativa del valor asignado al material de referencia certificado es 1,08%, que aplicada al resultado obtenido (7,0 mg/L) corresponde a una incertidumbre estándar de 0,08 mg/L.
- Precisión interdiaria. El procedimiento de *medición* tiene un comportamiento heteroscedástico con un coeficiente de variación metrológico aproximadamente constante a lo largo del intervalo de *medición* igual al 3 %. Este coeficiente de variación corresponde a la incertidumbre estándar relativa debida a la precisión interdiaria, que aplicada al resultado obtenido (7,0 mg/L) es igual a 0,21 mg/L.

Una vez calculadas las incertidumbres estándares de cada uno de los componentes de la incertidumbre ya se puede calcular la incertidumbre estándar combinada:

$$u_c = [(0,08 \text{ mg/L})^2 + (0,21 \text{ mg/L})^2]^{0,5} = 0,22 \text{ mg/L}$$

Finalmente, calcularemos la incertidumbre expandida con un nivel de confianza del 95 %, por lo que multiplicaremos la incertidumbre estándar combinada por el factor de cobertura igual a 2:

$$U = u_c \times k = 0,22 \text{ mg/L} \times 2 = 0,44 \text{ mg/L}$$

Así pues, el resultado definitivo, después de redondear el valor de la incertidumbre expandida al mismo dígito significativo con que habitualmente se dan los resultados de la medición de la magnitud considerada, será:

Uri-Albúmina; concentración de masa (SRM 927) = (7,0 ± 0,4) mg/L

### 3.5 Uso de los programas de control interno y externo para la obtención de la incertidumbre

La incertidumbre es factible a partir de los ensayos de aptitud y del programa de control interno de cada laboratorio clínico.

En los ensayos de aptitud es común que al laboratorio le reporten un valor de índice de desviación (ID), o una puntuación del índice de varianza (PIV) en ambos casos le proporcionan un valor del sesgo respecto al valor de consenso o al valor considerado como verdadero.<sup>20</sup>

Supongamos que para un valor de urea, al laboratorio participante le proporcionan su sesgo de 2,45; 2,3; 4; 2,1; 3 y 3,1 respectivamente en un periodo de 6 meses, con lo cual tendrá un sesgo promedio para ese mensurando de 2,825 en dicho periodo.

Por otra parte si para ese mismo mensurando, los resultados del control de calidad interno de los últimos treinta días, dan una desviación estándar de 3,05, es posible determinar, con estos valores, el ECM para la urea, en los siguientes términos.

$$ECM = \sqrt{b^2 + s^2}$$

$$ECM = \sqrt{(2,825)^2 + (3,05)^2}$$

$$ECM = \sqrt{7,9806 + 9,3025}$$

$$ECM = \sqrt{17,2806}$$

$$ECM = 4,15$$

El valor del ECM, 4,15 corresponde al valor de la incertidumbre para la medición de urea del laboratorio