



UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
ESPECIALIDAD EN QUÍMICA CLÍNICA

APLICACIÓN DE UN PROTOCOLO BASADO EN LA GUÍA EP06-A DE LA CLSI
PARA VERIFICACIÓN DEL INTERVALO DE LINEALIDAD Y VERIFICACIÓN DE
LA CALIBRACIÓN DE 13 PARÁMETROS BIOQUÍMICOS EN UN ANALIZADOR
AU680-BECKMAN COULTER – DEL HOSPITAL SAN JUAN DE DIOS.

Trabajo final de investigación aplicada sometido a la consideración de la comisión del
Programa de Estudios de Posgrado en Microbiología para optar por el grado y título de
Especialidad en Química Clínica

Estudiante: Keylor Arroyo Gutiérrez

Carné: B00653

Ciudad Universitaria Rodrigo Facio, Costa Rica

2021

Dedicatoria

Quiero dedicar el presente trabajo final de graduación a quienes siempre me han tendido su mano cuando lo he necesitado, a ellos que son mi ejemplo de vida; y porque mis logros son también sus logros,

Gracias Papá y Mamá

Agradecimientos

Gracias a Dios por permitirme concluir satisfactoriamente este trabajo final de graduación.

Gracias a mis profesores de posgrado, quienes me han transmitido muchos de sus conocimientos y por motivarme al crecimiento personal y académico, así como a la Universidad de Costa Rica por una vez más abrirme sus puertas para el aprendizaje y el crecimiento profesional.

Gracias al Dr. Marlon Matamoros Araya por compartir todo su conocimiento y ser mi maestro en todo este proceso, así como a la Dra. Nydia Lobo Inneckén por abrirme las puertas del laboratorio que lidera para poder realizar mis ensayos experimentales.

Gracias infinitas a mi familia, quienes me han apoyado en este proceso y en mi vida académica, por ser mi inspiración para nunca dejar de intentarlo y por haberme enseñado que con esfuerzo y dedicación soy capaz de alcanzar cualquier meta que me proponga.



SISTEMA DE ESTUDIOS EN POSGRADO
PROGRAMA DE POSGRADO EN ESPECIALIDADES EN MICROBIOLOGÍA

ACTA-48-2020

Acta presentación de Requisito Final de Graduación Trabajo de Investigación

Sesión del Tribunal Examinador celebrada el miércoles 16 de diciembre con el objeto de recibir el informe oral del estudiante José Keylor Arroyo Gutiérrez carné #B00653, quien se acoge al Reglamento General del Sistema de Estudios de Posgrado para presentar el Trabajo Final de Graduación, para optar por el grado académico de Especialista en Química Clínica. Están presentes los siguientes miembros del Tribunal Examinador: MSc. Ileana Holst Schumacher, quien preside, lectora, MSc. Manuel Jiménez Díaz, PhD., lector y Marianela Vargas Umaña, tutora.

ARTICULO 1

Quien preside solicita al postulante realizar la presentación oral de su Trabajo de Investigación titulado: "Aplicación de un protocolo basado en la guía EP06-A de la CLSI para verificación del intervalo de linealidad y verificación de la calibración de 13 parámetros bioquímicos en un analizador AU680-Beckman Coulter- del Hospital San Juan de Dios".

ARTICULO 2

Terminada la disertación, los miembros del Tribunal Examinador interrogan al postulante durante el tiempo reglamentario y, una vez concluido el interrogatorio, el Tribunal se retira a deliberar.

ARTICULO 3

El Tribunal Examinador declara el Trabajo Final de Graduación: Aprobado [X] Reprobado []

ARTICULO 4

Se da lectura al acta que firman los miembros del Tribunal Examinador y el Postulante, a las 18:15 horas.

Table with 3 columns: Nombre, Firma, No. Cédula. Rows include Ileana Holst Schumacher, Marianela Vargas Umaña, Manuel Jiménez Díaz, and José Keylor Arroyo Gutiérrez.

Observaciones: _____

Nota: Solamente firmarán el acta los responsables de la actividad descrita

Tabla de Contenidos

Resumen	vii
Lista de Cuadros	viii
Lista de Figuras.....	x
Lista de Abreviaturas.....	xii
Introducción.....	1
Planteamiento del Problema	11
Justificación	8
Objetivo General.....	12
Objetivos Específicos	12
Metodología y Desarrollo Experimental.....	13
Evaluación de la exactitud.....	16
Evaluación de la linealidad.....	17
Resultados.....	20
Glucosa	20
Triglicéridos.....	21
Nitrógeno Ureico	22
Creatinina.....	23
Colesterol.....	24
Ácido Úrico	25
ALT.....	26

AST	27
CK	28
ALP	29
LDH	30
GGT	31
AMY	32
Resumen de los resultados	34
Discusión	37
Verificación de la Calibración	41
Verificación de la Linealidad	49
Conclusiones	52
Referencias	55

Resumen

Se aplicó un protocolo basado en la guía EP06-A de la CLSI para verificación del intervalo de linealidad y verificación de la calibración de los parámetros analíticos: glucosa, triglicéridos, nitrógeno ureico, creatinina, colesterol, ácido úrico, ALT, AST, CK, ALP, LDH, GGT y AMY en un analizador AU680 de Beckman Coulter del Hospital San Juan de Dios con el objetivo de evaluar el desempeño analítico de estas pruebas.

Para aplicar el protocolo se utilizó el material comercial Verichem con estándares fabricados para este fin, y se evaluaron los resultados según el informe generado por el software del fabricante del material.

Los resultados muestran que parámetros que se calibran en la plataforma analítica evaluada como: glucosa, triglicéridos, nitrógeno ureico, creatinina, colesterol y ácido úrico, y algunos que no se calibran como: ALT, AST y CK; muestran una verificación de calibración y del intervalo de linealidad dentro de los estándares de desempeño analítico según la meta de calidad analítica (CLIA) seleccionada.

Las enzimas como: ALP, GGT, LDH y AMY las cuales poseen un factor MB fijo desde su instalación, presentan problemas en el protocolo de verificación de la calibración más no en el de linealidad, asociados a factores de correlación aplicados para compensar sesgos observados en el control de calidad externo.

Se concluye que no existe una estandarización por parte del fabricante del método para calibrar enzimas en su plataforma analítica, por lo que, dependiendo del material comercial utilizado, para aplicar el protocolo de verificación de calibración y dependiendo del material utilizado como control de calidad externo se pueden presentar inconsistencias en los resultados del protocolo aplicado.

Lista de Cuadros

	Página
Cuadro 1. Kits comerciales marca Verichem utilizados para la aplicación del protocolo de verificación de calibración y linealidad en el analizador AU680 de Beckman Coulter.	14
Cuadro 2. Ajustes en el factor de correlación realizados en el analizador AU680 evaluado para corregir un sesgo constante o proporcional, según resultado del control de calidad externo RIQAS.	15
Cuadro 3. Criterio de clasificación de la exactitud basado en la diferencia del valor reportado con el valor de referencia, respecto a la meta de calidad (ETa).	16
Cuadro 4. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para glucosa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,023$ y $B=0,0$. $Eta=6$ mg/dl o 10 % (CLIA).	20
Cuadro 5. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para triglicéridos sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,005$ y $B=0,0$. $Eta=10$ mg/dl o 25 % (CLIA).	21
Cuadro 6. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para nitrógeno ureico sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,015$ y $B=0,0$. $Eta=2$ mg/dl o 9 % (CLIA).	22
Cuadro 7. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para creatinina sin ajuste de factor de correlación $A=1$ y $B=0,0$. $Eta=0,3$ mg/dl o 15 % (CLIA).	23
Cuadro 8. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para colesterol sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,035$ y $B=0,0$. $Eta=10$ mg/dl o 10 % (CLIA).	24
Cuadro 9. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para ácido úrico sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,035$ y $B=0,0$. $Eta=0,35$ mg/dl o 17 % (CLIA).	25
Cuadro 10. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Alanina-Aminotransferasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,094$ y $B=0,0$. $Eta=10$ U/L o 20 % (CLIA).	26
Cuadro 11. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Aspartato-Aminotransferasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,12$ y $B=0,0$. $Eta=10$ U/L o 20 % (CLIA).	27
Cuadro 12. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Creatina-Kinasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,1356$ y $B=0,0$. $Eta=15$ U/L o 30 % (CLIA).	28
Cuadro 13. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Fosfatasa Alcalina sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,2935$ y $B=-28,25$. $Eta=10$ U/L o 30 % (CLIA).	29

Cuadro 14. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Lactato Deshidrogenasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,0255$ y $B=0,0$. $E_{ta}=25$ U/L o 20 % (CLIA).	30
Cuadro 15. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Gamaglutamil-transferasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,14$ y $B=0,0$. $E_{ta}=10$ U/L o 20 % (CLIA).	31
Cuadro 16. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Amilasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=0,88$ y $B=7,26$. $E_{ta}=10$ U/L o 30 % (CLIA).	32
Cuadro 17. Resumen de los resultados para verificación de la calibración y linealidad de los 13 parámetros dentro del alcance del estudio.	34
Cuadro 18. Resumen del intervalo de medición analítica verificado con y sin ajustes del factor de correlación en comparación con el reportado por fabricante.	35
Cuadro 19. Porcentaje de error para las diferencia de medias del control interno BIORAD del laboratorio en comparación con la media del grupo par para la misma metodología sin y con calibrador Ref.66300 del programa de control interlaboratorial Unity.	35

Lista de Figuras

	Página
Figura 1. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Glucosa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	21
Figura 2. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Triglicéridos sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	22
Figura 3. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Nitrógeno Ureico sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	23
Figura 4. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Creatinina sin ajuste (A) y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (B).	24
Figura 5. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Colesterol sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	25
Figura 6. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Ácido Úrico sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	26
Figura 7. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Alanina-Aminotransferasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	27
Figura 8. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Aspartato-Aminotransferasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	28
Figura 9. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Creatina-Kinasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	29
Figura 10. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Fosfatasa Alcalina sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	30
Figura 11. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Lactato Deshidrogenasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	31

Figura 12. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Gamaglutamil-transferasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	32
Figura 13. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Amilasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).	33
Figura 14. Resumen de categoría de sesgo (A=1, B=2, C=3, D=4, F=5) para cada analito dentro del alcance del estudio con y sin ajustes del factor de correlación.	34
Figura 15. Porcentaje de error para las diferencias de las medias del control interno interlaboratorio (Unity) para enzimas, utilizando como referencia la media del grupo para la misma metodología sin y con el calibrador de enzimas Ref. 66300 (Master Calibrator)	36

Lista de Abreviaturas

ALP	Fosfatasa Alcalina
ALT	Alanina-Aminotransferasa
AMY	Amilasa
AMR	Rango de Medición Analítica
AST	Aspartato-Aminotransferasa
BUN	Nitrógeno Ureico
CAP	Colégio Americano de Patólogos
CK	Creatina Kinasa
CLIA	Enmiendas de Mejora de Laboratorios Clínicos de 1988
CLSI	Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio
CCSS	Caja Costarricense del Seguro Social
ECA	Ente Costarricense de Acreditación
EP06-A	Guía de Evaluación de la Linealidad de Procedimientos de Medición Cuantitativa
ETa	Error Total Aceptable
FDA	Administración de Alimentos y Medicamentos
GGT	Gama-Glutamiltransferasa
ISO	Organización Internacional de Estandarización
LDH	Lactato Deshidrogenasa



Autorización para digitalización y comunicación pública de Trabajos Finales de Graduación del Sistema de Estudios de Posgrado en el Repositorio Institucional de la Universidad de Costa Rica.

Yo, Jose Keylor Amayo Gutierrez, con cédula de identidad 114960611, en mi condición de autor del TFG titulado Aplicación de un protocolo basado en la guía EPOG-A de la CCSI para verificación del intervalo de linealidad y verificación de la calibración de 13 parámetros bioquímicos en un analizador AUG80-Beckman Coulter del Hospital San Juan de Dios
Autorizo a la Universidad de Costa Rica para digitalizar y hacer divulgación pública de forma gratuita de dicho TFG a través del Repositorio Institucional u otro medio electrónico, para ser puesto a disposición del público según lo que establezca el Sistema de Estudios de Posgrado. SI NO *

*En caso de la negativa favor indicar el tiempo de restricción: _____ año (s).

Este Trabajo Final de Graduación será publicado en formato PDF, o en el formato que en el momento se establezca, de tal forma que el acceso al mismo sea libre, con el fin de permitir la consulta e impresión, pero no su modificación.

Manifiesto que mi Trabajo Final de Graduación fue debidamente subido al sistema digital Kerwá y su contenido corresponde al documento original que sirvió para la obtención de mi título, y que su información no infringe ni violenta ningún derecho a terceros. El TFG además cuenta con el visto bueno de mi Director (a) de Tesis o Tutor (a) y cumplió con lo establecido en la revisión del Formato por parte del Sistema de Estudios de Posgrado.

INFORMACIÓN DEL ESTUDIANTE:

Nombre Completo: Jose Keylor Amayo Gutierrez

Número de Carné: B00653 Número de cédula: 1-1496-0611

Correo Electrónico: keyloramayo27@hotmail.com

Fecha: 20/01/2021 Número de teléfono: 8727-7807

Nombre del Director (a) de Tesis o Tutor (a): Maricela Vargas Umaña

FIRMA ESTUDIANTE

Nota: El presente documento constituye una declaración jurada, cuyos alcances aseguran a la Universidad, que su contenido sea tomado como cierto. Su importancia radica en que permite abreviar procedimientos administrativos, y al mismo tiempo genera una responsabilidad legal para que quien declare contrario a la verdad de lo que manifiesta, puede como consecuencia, enfrentar un proceso penal por delito de perjurio, tipificado en el artículo 318 de nuestro Código Penal. Lo anterior implica que el estudiante se vea forzado a realizar su mayor esfuerzo para que no sólo incluya información veraz en la Licencia de Publicación, sino que también realice diligentemente la gestión de subir el documento correcto en la plataforma digital Kerwá.

Introducción

Los laboratorios clínicos regulados por las Enmiendas de Mejora de los Laboratorios Clínicos de 1988 (CLIA por sus siglas en inglés), o acreditados por el Colegio Americano de Patólogos (CAP), deben de demostrar de forma periódica el cumplimiento de ciertos criterios mínimos de desempeño analítico, dentro de los cuales se incluyen la verificación de la calibración, y la verificación del intervalo analítico reportable mediante el programa de verificación de la calibración y la linealidad (Killen et al, 2014).

El programa de verificación de la calibración y linealidad, incluye una serie de términos relacionados entre sí que se utilizan indistintamente para referirse al mismo concepto, por ejemplo, el término verificación del intervalo de medición analítica está relacionado con la estimación del intervalo lineal de un procedimiento de medida o un método de ensayo, por otro lado, la verificación de la calibración es un término empleado para referirse a la forma de estimar la exactitud de un procedimiento de medida.

La linealidad se define como la habilidad, dentro de un intervalo de concentraciones, de proveer resultados que son directamente proporcionales con la concentración de un analito en la muestra y se estima procesando muestras con una concentración conocida, o con una concentración relativa entre las diluciones a lo largo del intervalo analítico de la prueba, este último definido como las concentraciones mínima y máxima del mensurando dentro de las cuales el error del instrumento de medición está por debajo de los límites especificados (CLSI EP6-A, 2003).

La exactitud de medida se define como la proximidad que existe entre un valor medido y un valor verdadero de un mensurando, obtenido mediante mediciones repetidas. Se determina mediante el ensayo de materiales de concentración conocida de la misma manera que las muestras de pacientes para corroborar la calibración del instrumento abarcando la mayoría el intervalo analítico reportable (Araujo, 2009) (Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia, 2012).

Para los sistemas aprobados por la Administración de Drogas y Alimentos de Estados Unidos (FDA por sus siglas en inglés) y según las regulaciones de CLIA, se requiere que los laboratorios realicen un protocolo de verificación de la calibración y linealidad, como mínimo cada 6 meses, o cuando lo amerite realizar por un desempeño deficiente de control de calidad, cuando se realiza un cambio importante una pieza del instrumento, o un mantenimiento preventivo significativo del analizador, o incluso un cambio a nuevos números de lote de reactivos a menos que el laboratorio pueda probar que esto no afecta la calibración (Killen et al, 2014).

En múltiples ocasiones se realiza una verificación de la linealidad aplicando un protocolo de verificación de la calibración de forma errónea, ya que se confunde el requisito de verificación de la calibración con el de verificación la linealidad. Sin embargo, el objetivo de aplicación de ambos protocolos es distinta, y lo requerimientos para su aplicación también lo son.

La verificación de la calibración implica la medición de analitos en calibradores u otras muestras de valores conocidos trazables a un método de referencia para confirmar que la relación establecida se ha mantenido estable y por lo tanto es útil para determinar la exactitud del método analítico. Por el contrario, no es necesario conocer la concentración absoluta para realizar una verificación de la linealidad, es la relación de línea recta entre puntos lo que es el foco de interés en este protocolo (Jhang et al, 2004).

Para evaluar la linealidad de métodos analíticos cuantitativos se puede emplear la guía de verificación EP06-A (Evaluation of linearity of Quatitative Measurement Procedures) de la CLSI (Clinical Laboratory Standars Institute), donde se especifica el procedimiento completo, diseño del ensayo, aplicación, tabulación de resultados, elaboración de gráficas de interpretación y análisis estadístico robusto de los datos, bajo distintos criterios de aceptación o rechazo de la linealidad del método evaluado.

La guía EP06-A establece que para realizar una verificación de la linealidad o del intervalo de medición analítica se pueden utilizar diferentes materiales, dentro de los cuales encontramos:

1. Pool de muestras de pacientes
2. Pool de muestras de pacientes suplementadas con el mensurando de interés
3. Pool de muestras de pacientes diluidas con un diluyente recomendado
4. Pool diluido con materiales tratados de baja concentración
5. Controles, calibradores o materiales comerciales para estudio de linealidad
6. Pool diluido con solución salina u otros diluyentes diferentes al recomendado
7. Material de control comercial diluido con diferente volumen del establecido
8. Soluciones acuosas
9. Disoluciones en otros disolventes

La guía hace la salvedad que lo ideal es utilizar material con el cual se reduce al máximo el efecto matriz (diferencias entre la matriz del material utilizado y la matriz de muestras de pacientes), por lo que se recomienda el uso de muestras de pacientes, sin embargo, se debe de tomar en cuenta que las muestras de pacientes pueden generar un sesgo analítico por efecto de presencia de interferentes y además porque requieren realizar diluciones manuales o pretratamiento que pueden aumentar el error analítico y afectar la precisión en condiciones de repetibilidad del ensayo.

Además, para muchos de los analitos dentro del alcance de la verificación, es complejo recuperar muestras de pacientes cuya concentración o actividad analítica alcance los límites máximos de linealidad reportados por el fabricante, y es por esta razón que la guía permite el uso de un material comercial destinado para este fin con una matriz no muy distinta a la muestra de los pacientes, el cual debe ser analizado de la misma forma a como se analizan las muestras de rutina en la plataforma analítica (CLSI EP6-A, 2003).

Para realizar el ensayo de linealidad se deben de utilizar un número de muestras y replicados dependientes del objetivo del ensayo (CLSI EP6-A, 2003)

1. Para establecer el intervalo de linealidad: Se deben de analizar entre 7 y 11 niveles y realizar de 2 a 4 replicados de cada nivel, además se recomienda que las concentraciones a evaluar se encuentren en un intervalo que sea 20% a 30% más amplio que el intervalo previsto y así eliminar los puntos no lineales para establecer el intervalo analítico más amplio posible donde se cumplen las especificaciones de linealidad.

2. Para verificar el intervalo de linealidad establecido por el fabricante: Se deben de analizar entre 5 y 7 niveles de concentración y realizar 2 replicados como mínimo para cada nivel. Se recomienda que los niveles con la menor y mayor concentración a evaluar sean lo más similar posible a los valores límites establecidos por el fabricante.

En ambos casos, queda a criterio del evaluador aumentar el número de réplicas por nivel a partir del recomendado y se deben de procesar los diferentes puntos a evaluar de forma aleatoria dentro de una misma corrida, se permite un único valor aberrante (outlier) en toda la corrida, en caso de presentar más de un valor aberrante determinado mediante la observación del gráfico de regresión o mediante algún método estadístico, se debe de evaluar la causa del error, corregirla y repetir el ensayo (CLSI EP6-A, 2003).

En caso de utilizar muestras de pacientes con una concentración cercana al valor máximo y mínimo del intervalo reportable establecido por el fabricante se debe de realizar diluciones con ambas muestras para crear concentraciones a lo largo del intervalo analítico de la prueba, se recomienda evaluar concentraciones cercanas a los valores de decisión clínica según el mensurando a evaluar, para esto se puede seguir un esquema de diluciones recomendado por la misma guía (CLSI EP6-A, 2003).

Para determinar si en los distintos puntos de evaluación, la verificación de la linealidad es aceptable, se deben de definir previamente las metas de error (Error total aceptable - ETa) para cada analito, y así entonces, las metas de linealidad se definen como un porcentaje del error total (aceptable para el mensurando), de forma que, el resultado de

sesgo en cada punto debe ser igual o inferior al porcentaje de error máximo permitido definido a partir el ETa (CLSI EP6-A, 2003).

En caso de utilizar un material comercial para realizar la verificación de la calibración y linealidad, la guía EP06-A recomienda seguir las indicaciones del fabricante del material, respecto al procesamiento y análisis de los resultados obtenidos. Se recomienda que este material no requiera reconstitución y cuya matriz sea lo más similar a la matriz de las muestras para las cuales se evaluará la linealidad de los distintos analitos (alta conmutabilidad), además que abarquen en la mayor medida posible el intervalo de medición analítica reportado por el fabricante del instrumento o analizador (CLSI EP6-A, 2003).

Para la evaluación de los resultados y obtener conclusiones respecto a la verificación de la linealidad del intervalo de medición analítica, la guía EP06-A describe un método basado en la evaluación de si un polinomio no lineal de segundo o tercer orden ajusta los datos mejor que uno lineal (CLSI EP6-A, 2003).

El método polinomial consiste en la utilización de técnicas de regresión lineal para encontrar el polinomio que mejor se ajusta a los datos. El procedimiento calcula la ecuación de regresión y utiliza pruebas estadísticas para determinar si los datos se modelan mejor mediante una ecuación lineal, cuadrática o cúbica mediante un coeficiente de significancia estadística con una prueba t. Si después de ajustar los datos a los 3 modelos el coeficiente de no linealidad no es estadísticamente significativo entonces el método cumple con el criterio de linealidad (Kroll et al, 2000)(Jhang et al, 2004).

Cuando el resultado de error de no linealidad es estadísticamente significativo, es decir que los datos son explicados por una ecuación cuadrática o cúbica, estos datos son sometidos a una verificación adicional para determinar si la no linealidad de los datos es clínicamente significativa. Para esto se calcula la diferencia o distancia entre el resultado de no linealidad y una línea de mejor ajuste de los datos y esta distancia se compara con el error máximo de no linealidad aceptable para el método de ensayo (sesgo), obtenido a partir de una meta de calidad analítica previamente definida (Jhang et al, 2004).

Cabe destacar que para realizar una interpretación correcta de los resultado de linealidad estos deben de ser reproducibles entre sí (poca variabilidad) por lo que con los resultados obtenidos se estima la desviación estándar (SD) o el coeficiente de variación (CV %) en cada punto de evaluación, el cual se espera, sea inferior al error aleatorio máximo permitido derivado de la meta de calidad. Sin embargo, en caso de que la imprecisión resultante sea mayor que el límite permitido se recomienda realizar una verificación de la precisión con la guía EP5 o la guía EP15-A3 (CLSI EP6-A, 2003).

El protocolo de verificación de la calibración, consiste en procesar réplicas de muestras con concentración conocida de preferencia trazable a un método de referencia a lo largo del intervalo analítico de la prueba, y su evaluación consiste en la estimación de la diferencia de la media de los resultados, respecto al valor de referencia, el cual debe ser inferior al presupuesto de sesgo establecido a partir de la meta de calidad analítica.

Si contamos con un material de referencia, con concentraciones a lo largo del intervalo analítico de la prueba, entonces es posible aplicar tanto un protocolo de verificación de linealidad como de calibración. Sin embargo, el análisis de los resultados y los criterios de aceptación en cada caso son distintos.

En caso de utilizar material comercial diseñado para una verificación de la linealidad y calibración, la guía EP06-A especifica que se de aplicar el protocolo de linealidad bajo las recomendaciones del fabricante del producto y el análisis de los datos está sujeto al método de análisis empleado por el Software del material seleccionado. Muchos de estos Software parten del principio de no linealidad de los datos, por lo que aplican el método de análisis basado en una meta de calidad analítica, descrito anteriormente (CLSI EP6-A, 2003).

Verichem Laboratories fabrica una serie de kits comerciales específicamente diseñados para correr un protocolo de verificación de calibración. Cada kit consiste en un material líquido congelado a base de matriz proteica bovina (para analitos en suero), cuyos resultados permiten evaluar la exactitud del instrumento de medida para los diferentes

parámetros analíticos dentro del alcance del kit y además permite estimar el cumplimiento del criterio de linealidad a lo largo del intervalo de medición analítica.

Justificación

Los laboratorios clínicos pertenecientes a la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) no cuentan con un ente externo encargado de regular el desempeño analítico de sus analizadores, ni tampoco son laboratorios acreditados sometidos a fiscalización, razón por la cual no es requisito fundamental aplicar protocolos de verificación de equipos, como el protocolo de verificación de linealidad y calibración.

La verificación de la linealidad es un procedimiento importante no solamente para verificar que efectivamente se cumplen las especificaciones definidas por el fabricante al momento de la instalación, sino tal como lo establece el CLIA y CAP, es recomendable realizar una verificación del intervalo de medición analítica y exactitud durante el período de uso del analizador cuando éste lo requiera, o como mínimo cada 6 meses, debido a que el desempeño analítico puede verse afectado por variables inherentes al manejo de reactivos (cambio de lotes) o procedimientos de mantenimiento preventivo o correctivo robustos.

Si bien es cierto, los laboratorios clínicos cuentan con herramientas de control de calidad interno y externo que les permite determinar la precisión y veracidad de los procedimientos de medida, respectivamente, estos controles no permiten evaluar el desempeño a lo largo de todo el intervalo de medición analítica de cada parámetro, ya que usualmente con el control interno se evalúan un par de concentraciones de importancia clínica, y con el control externo de igual forma se evalúan ciertas concentraciones entre alícuotas dentro de un mismo ciclo.

Además, el uso de un control de calidad externo interlaboratorial cuyo valor de comparación es obtenido mediante la media del resultado reportado por el grupo con el mismo analizador y con el mismo método (grupo par), tal como lo hace RIQAS (Control Externo Interlaboratorial), permite evaluar el sesgo respecto a los demás analizadores dentro de su grupo par. Sin embargo, al no utilizar un método de referencia para establecer el valor objetivo, limita la detección de un sesgo analítico frente a un valor de referencia trazable a

un método normalizado y por lo tanto ante resultados satisfactorios, no podemos descartar una inexactitud del instrumento de medida (Randox, 2020).

En el caso del analizador AU680, para parámetros de bioquímica básica como Colesterol, Triglicéridos, Glucosa, Ácido Úrico, Nitrógeno Ureico y Creatinina se cuenta con un calibrador como mínimo, el cual según lo establecido por el fabricante se debe de correr con cada cambio de lote de reactivo, en algunas ocasiones con cambio de frasco de reactivo, o cada cierto tiempo pre-establecido, y así se logran compensar las variaciones asociadas a la fabricación del reactivo o cambios de piezas en mantenimientos robustos.

En América, según las especificaciones de inserto, las enzimas como ALT, AST, CK, LDH, ALP, AMY y GGT en suero, no se calibran, una vez se instala el analizador se realiza un protocolo definido por fabricante para establecer un factor de calibración (MB), el cual permanece constante durante todo el período de uso del analizador, de forma que las variaciones entre cambios de lotes de reactivos o mantenimientos del analizador, son compensadas mediante modificaciones o ajuste del “factor de correlación” o “factor de fabricante”.

En Europa, para el mismo analizador AU680, según su inserto se utiliza un calibrador de enzimas “System Calibrator” (Ref.66300), trazable en su mayoría a métodos normalizados estandarizados, el cual se utiliza para definir un factor MB cada vez que sea necesario por un cambio de pieza del instrumento o cada vez que ocurra un cambio en el desempeño analítico de la prueba, de forma que ante variaciones de desempeño no es necesario aplicar ajustes de factores para compensar el sesgo, sino realizar una recalibración de las pruebas.

En la actualidad en Costa Rica no contamos con dicho calibrador por lo que para estimar la magnitud del ajuste a realizar se aplica un cálculo matemático basado en el sesgo observado en el control de calidad externo RIQAS, y una posterior modificación de dicho factor, en “A” para corregir errores sistemáticos constantes lo que equivale a la pendiente de

la recta y en “B” para corregir errores sistemáticos asociados a la concentración (propocionales) lo que equivale al intercepto de la recta.

Ante la limitante de no contar con el System Calibrator para enzimas y vernos ante la necesidad de aplicar estos ajustes basados en el sesgo reportado en RIQAS, puede que estos ajustes en pendiente e intercepto de la prueba estén induciendo a un error de inexactitud del método analítico, o que afecten el desempeño de la prueba a lo largo del intervalo analítico de misma y por lo tanto la linealidad.

Este ensayo pretende aplicar un protocolo de verificación de la calibración y linealidad en un analizador AU680 del laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios basado en la guía de la CLSI EP6-A, según las especificaciones del fabricante del material seleccionado, empleando como meta de calidad analítica (ETa) las definidas por CLIA, que corresponden a las metas predefinidas por el laboratorio, con el fin de evaluar los resultados de exactitud y linealidad a lo largo del intervalo de medición analítica reportado por fabricante, con los ajustes de factor de correlación realizados para corregir sesgos observados en el programa de control de calidad externo RIQAS.

Planteamiento del Problema

En el analizador AU680 del Laboratorio Clínico del Hospital San Juan de Dios, destinado para procesar muestras de Hospital, no se ha procesado un protocolo de verificación de calibración y linealidad y se desconoce si con el transcurso del tiempo se han alterado estas funciones. Además se han aplicado factores de ajuste para corregir los sesgos observados en el control de calidad externo, lo cual podría comprometer el desempeño analítico de las pruebas, principalmente enzimas las cuales, según el fabricante, mantienen un factor de calibración MB constante desde su instalación.

Objetivo General

Aplicar un protocolo de verificación de la calibración y linealidad para los analitos: Cretina Kinasa (CK), Lactato deshidrogenasa (LDH), Fosfatasa Alcalina (ALP), Alanina-Aminotransferasa (ALT), Aspartato-Aminotransferasa (AST), Amilasa (AMY), Gama-glutamilttransferasa (GGT), Ácido Úrico, Colesterol, Glucosa, Triglicéridos, Nitrógeno Uréico (BUN) y Creatinina para evaluar la exactitud y el intervalo analítico en la plataforma AU680 Beckman Coulter.

Objetivos Específicos

1. Seleccionar un material comercial diseñado para estimación de la exactitud y del intervalo analítico reportable de 13 analitos distintos de la plataforma de química clínica AU680 de Beckman Coulter.
2. Analizar el material comercial seleccionado en la plataforma AU680 de Beckman Coulter para obtener los resultados de acuerdo con el protocolo basado en la guía EP6-A de la CLSI.
3. Evaluar los resultados del protocolo de verificación de calibración y linealidad para cumplimiento de metas de calidad establecidas por CLIA.
4. Comparar los resultados obtenidos de verificación de calibración y linealidad, con y sin ajustes matemáticos del factor de correlación para evidenciar diferencias producto de dichos ajustes.

Metodología y Desarrollo Experimental

Se aplicó el protocolo de verificación de calibración y de linealidad basado en la guía EP06-A de la CLSI para procedimientos analíticos cuantitativos, para lo cual se adquirió un material de referencia comercial para este fin, de la compañía “Verichem Laboratories” específico para cada plataforma analítica, los cuales incluyen un total de 5 a 7 viales con diferentes concentraciones de los analitos de interés.

Los kit utilizados para aplicar el protocolo a las pruebas de Glucosa, Creatinina, Nitrógeno Ureico, Colesterol y Ácido Úrico (Matrix Plus Chemistry y Matrix Plus Cholesterol), presentan 5 niveles de concentración diferentes, preparados por método gravimétrico, e incluyen un certificado de verificación con un estándar de referencia del NIST (National Institute of Standards and Technology). Para triglicéridos, las concentraciones fueron verificadas utilizando estándares gravimétricos independientes preparados con glicerol según las especificaciones grado reactivo de la ACS (American Chemical Society).

El kit utilizado para aplicar el protocolo en las enzimas (Enzyme ER Verifier) presenta 6 niveles diferentes, cuya actividad enzimática reportada como valor objetivo varía entre instrumentos, ya que Verichem envía el material a analizar a las instalaciones del fabricante quien reporta el valor esperado para la plataforma analítica en específico. En el caso de Beckman Coulter para sus analizadores AU y DxC700AU, los valores esperados para actividad enzimática son dados por el fabricante en las instalaciones de Beckman Coulter en Brea, California 92822-8000, Estados Unidos (Ver cuadro 1).

Cuadro 1. Kits comerciales marca Verichem utilizados para la aplicación del protocolo de verificación de calibración y linealidad en el analizador AU680 de Beckman Coulter.

Nombre del Kit	Lote	Caducidad	Prueba	Concentración						Unidades	Rango analítico de fabricante	
				Nivel A	Nivel B	Nivel C	Nivel D	Nivel E	Nivel F		Mínimo	Máximo
Matrix Plus Chemistry Reference Kit	C391106	30/10/20	Glucosa	25	200	375	550	725	----	mg/dL	10	800
			Creatinina	0,2	6,2	12,2	18,2	24,2	----	mg/dL	0,2	25
			Nitrógeno Ureico	5	37,5	70	102,5	135	----	mg/dL	2	130
			Triglicéridos	10	245	480	715	950	----	mg/dL	10	1000
Matrix Plus Cholesterol Reference Kit	G390108	30/8/20	Colesterol	40	155	270	385	500	----	mg/dL	25	700
			Ácido úrico	2	7	12	17	22	----	mg/dL	1,5	30
Enzyme ER Verifier Kit	H392707	30/10/20	ALP	7	46	399	786	1167	1544	U/L	5	1500
			ALT	2	15	125	246	366	481	U/L	3	500
			AMY	11	64	541	1059	1567	2067	U/L	10	2000
			AST	4	23	192	380	566	750	U/L	3	1000
			CK	8	60	517	1007	1492	1943	U/L	10	2000
			GGT	6	37	315	617	907	1180	U/L	3	1200
			LDH	8	41	330	634	920	1195	U/L	25	1200

El material seleccionado (Verichem) para las pruebas de glucosa, triglicéridos, creatinina, nitrógeno ureico, colesterol y ácido úrico corresponden a un producto líquido fabricado con albúmina bovina como base proteica, que incluye 5 niveles de concentración diferentes.

El kit de verificación de enzimas (contiene enzimas extraídas de diferentes fuentes animales: ALP de intestino de becerro, ALT, AST y CK de músculo cardiaco porcino, GGT de riñón bovino, LDH de corazón de pollo y AMY de páncreas porcino. Todas las enzimas se mantienen en un sistema bufferizado líquido a base de suero de albúmina bovino altamente purificado con etilenglicol como estabilizante. Otros ingredientes no reactivos son incluidos para mejorar el desempeño y estabilidad. El kit consta de 6 niveles diferentes de actividad enzimática.

Los kits “Matrix Plus Cholesterol” y “Matrix Plus Chemistry” se almacenan refrigerados entre 2 °C y 8 °C, y se mantienen estables hasta la fecha de expiración indicada en la caja del producto.

El kit “Enzyme ER Verifier” se almacena congelado entre -15 °C y -25 °C por lo cual para su procesamiento se siguieron las recomendaciones de fabricante reportadas en su inserto de material: atemperarlos a 18-25 °C hasta su descongelación completa, el tiempo de atemperado no puede exceder los 15 minutos.

Los kits seleccionados se procesaron una primera vez en el analizador AU680 por triplicado para cada nivel de concentración para cada analito dentro del alcance de este ensayo, procesando cada vial en una secuencia aleatoria según las recomendaciones de procesamiento de la guía EP6-A. Para este primer procesamiento se mantuvieron los ajustes del factor de correlación A y B en el analizador (Ver Cuadro 2).

Cuadro 2. Ajustes en el factor de correlación realizados en el analizador AU680 evaluado para corregir un sesgo constante o proporcional, según resultado del control de calidad externo RIQAS.

Prueba	Ajustes de Factor de Correlación	
	Factor "A" (Error constante)	Factor "B" (Error proporcional)
ALT	1,094	0
AST	1,120	0
CK	1,1356	0
ALP	1,2935	-28,25
LDH	1,0255	0
GGT	1,140	0
AMY	0,880	7,26
GLU	1,023	0
TRIG	1,005	0
BUN	1,015	0
CREA [†]	1,000	0
CHOL	1,035	0
URICO	1,035	0

[†]Creatinina (CREA) no cuenta con ninguna modificación del factor de correlación, se encuentra con los valores configurados de fábrica A=1 y B=0.

Posterior al primer análisis, se procedió a eliminar los ajustes realizados en el “factor de correlación”, es decir, se configuraron los ajustes originales de fábrica: A=1 y B=0, y se procesaron los kits una segunda vez en el mismo analizador por triplicado para cada nivel de concentración para cada analito dentro del alcance de forma aleatoria.

El material Verichem, ofrece un servicio de reducción de datos, que permite cargar los resultados de forma virtual a su página de internet y realiza un informe e interpretación de los resultados utilizando como meta de calidad las definidas por CLIA (CLIA, 1992).

Evaluación de la exactitud

Para evaluar la exactitud el fabricante del material utilizado especifica en su inserto, que se determina el porcentaje de recuperación entre el valor de la media reportado y el valor de referencia, y se clasifica con una letra desde A hasta F cada punto de evaluación basado en la diferencia absoluta entre la media y el valor objetivo, expresado como un porcentaje de error máximo permitido ETa (Ver Cuadro 3).

Cuadro 3. Criterio de clasificación de la exactitud basado en la diferencia del valor reportado con el valor de referencia, respecto a la meta de calidad (ETa).

Clasificación	(Media-Referencia)/TEa
A	25% o menos
B	25 - 50%
C	50 - 75%
D	75 - 100%
F	Mas de 100%

Un resultado de “B”o superior es considerado aceptable, y el punto evaluado cumple con el criterio de exactitud predefinido, un resultado de “C o D” se considera que pasa

marginalmente. El resultado final de cumplimiento de exactitud de cada prueba corresponde a la menor clasificación otorgada en alguno de sus puntos de evaluación.

El material Verichem además permite la comparación visual de los resultados obtenidos con un grupo de comparación o grupo par, conformado por al menos 5 analizadores de la serie AU de Beckman Coulter quienes han cargado resultados del kit de verificación de calibración y linealidad a su página de internet, mostrando en un gráfico el 100% de recuperación (Un porcentaje de error de 0%) para cada punto evaluado y 2 desviaciones estándar del grupo de comparación, esto con el fin de evaluar por observación si los resultados reportados se comportan similar a los resultados del grupo par.

Evaluación de la linealidad

Para el análisis de linealidad, el sistema de reducción de datos de Verichem establece como error máximo de no linealidad un 25% de la meta de calidad analítica ETa en cada punto de evaluación. Para esto los datos se grafican en una regresión en relación con una línea recta ajustada para los datos obtenidos, de forma que el porcentaje de error (distancia porcentual) entre la media de los resultados obtenidos y la media de los resultados explicada por una línea recta debe ser inferior al error máximo de no linealidad (25% del ETa) para asegurar su cumplimiento.

La verificación del intervalo de medición analítica se establece como el intervalo de valores evaluados dentro de los cuales los datos se comportan de forma lineal, de manera que si un punto de evaluación supera el error de no linealidad el software omite este punto y establece la linealidad entre los restantes (utilizando como mínimo 3 puntos de evaluación).

Además, el reporte incluye una ecuación de regresión de la recta con un valor de pendiente y de intercepto para los valores obtenidos versus los valores de referencia. Sin embargo, esta ecuación de regresión no se utiliza para evaluar linealidad.

El laboratorio de química clínica del Hospital San Juan de Dios utiliza como material de control interno los controles Liquid Assayed Multiquel de marca comercial BIORAD en

niveles 2 y 3 de concentración. Los controles BIORAD poseen un programa de control interno interlaboratorio (Unity), en el cual los laboratorios participantes cargan sus resultados de control interno proporcionando una media de comparación de los resultados por lo que funciona como una herramienta adicional para evaluar el error sistemático o sesgo.

Se realizó una comparación y estimación del porcentaje de error de la media acumulada del control interno con el control BIORAD del mes de octubre 2020, para el analizador AU680 evaluado, para el lote de control 45860, contra los resultados del grupo par reportados en el informe mensual de Unity para enzimas, para las metodologías con y sin calibrador (Mater Calibrator Ref. 66300).

Para seleccionar el material comercial adecuado para la aplicación del ensayo, según las recomendaciones de la guía EP6-A, se tomó en consideración los siguientes puntos:

1. Abarcar el mayor intervalo dinámico posible para cada uno de los analitos dentro del alcance de esta evaluación
2. Conmutabilidad del material utilizado
3. Disposición de software propio de análisis de datos
4. Estabilidad del material para transporte y almacenamiento
5. Material que permita aplicar protocolo de linealidad con valores equidistantes entre sí con mínimo de 5 niveles por kit
6. Material que permita aplicar el protocolo de verificación de calibración, mediante el aporte de valores de referencia conocidos con trazabilidad metrológica a un método o estándar de referencia

El fabricante del material Verichem declara en el inserto de cada kit que cumple con la mayoría de los requerimientos citados anteriormente, ya que cada kit es fabricado específicamente para cubrir la mayoría del intervalo dinámico de las principales casas comerciales, es conmutable a las muestras de pacientes por su matriz congelada de base proteica bovina, posee software propio de análisis de datos, el material es estable hasta la fecha de caducidad indicada en la caja de cada kit, además los valores de concentración

permiten aplicar el protocolo de linealidad y debido a que los valores poseen trazabilidad metrológica a estándar de referencia o a valores aportados por fabricante, son aptos para aplicar el protocolo de verificación de calibración.

Resultados

Para cada analito dentro del alcance de este estudio se obtuvieron resultados del protocolo de verificación de linealidad y de verificación de calibración con los ajustes matemáticos del factor de correlación y sin los ajustes para poder establecer el efecto del ajuste sobre los resultados.

Glucosa

Cuadro 4. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para glucosa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,023$ y $B=0,0$. $E_{ta}=6$ mg/dl o 10 % (CLIA).

GLU		Resultados				Exactitud				Linealidad				
SIN AJUSTES														
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	25	25,1	25,2	25,2	25,2	mg/dl	0,23	0,8	12	A	25,5	5,9	-1,2	PASA
Nivel B	200	199	200,4	201,2	200,5		0,56	0,3	5	A	199,2	2,5	0,7	PASA
Nivel C	375	375,3	374,9	374,5	374,9		0,11	0,0	5	A	373	2,5	0,5	PASA
Nivel D	550	543,3	543,7	542,8	543,3		0,08	-1,2	5	A	546,7	2,5	-0,6	PASA
Nivel E	725	717,3	715,3	716	716,2		0,14	-1,2	5	A	720,4	2,5	-0,6	PASA
CON AJUSTES														
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	25	25,4	25,4	25,4	25,4	mg/dl	0,00	1,6	12	A	25,7	5,8	-1,2	PASA
Nivel B	200	202	202,7	202,6	202,4		0,19	1,2	5	A	201,5	2,5	0,4	PASA
Nivel C	375	376,7	379,4	380,2	378,8		0,48	1,0	5	A	377,4	2,5	0,4	PASA
Nivel D	550	548,9	550,8	553,2	551		0,39	0,2	5	A	553,3	2,5	-0,4	PASA
Nivel E	725	724,6	724,7	728,6	726		0,31	0,1	5	A	729,2	2,5	-0,4	PASA

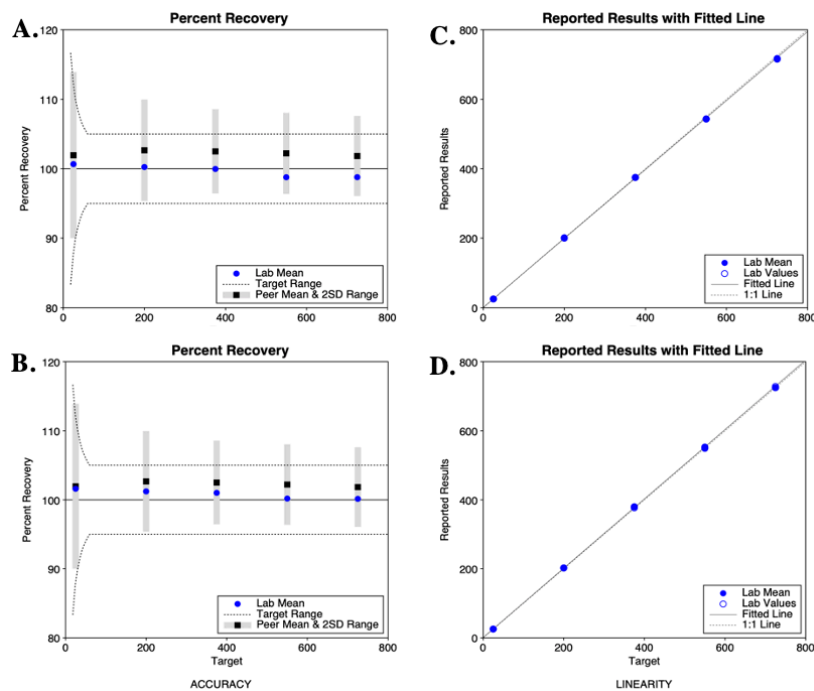


Figura 1. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Glucosa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

Triglicéridos

Cuadro 5. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para triglicéridos sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,005$ y $B=0,0$. $\text{Eta}=10$ mg/dl o 25 % (CLIA).

TRIG		Resultados					Exactitud				Linealidad			
		Replica 1	Replica 2	Replica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
SIN AJUSTES														
	Target													
Nivel A	10	10,48	10,58	10,58	10,5	mg/dl	0,55	5,0	50	A	10,9	23,0	-3,7	PASA
Nivel B	245	254,11	255,35	254,52	254,7		0,25	4,0	12,5	A	252,3	6,2	1,0	PASA
Nivel C	480	493,97	493,87	496,3	494,7		0,28	3,1	12,5	A	493,6	6,2	0,2	PASA
Nivel D	715	723,7	728,83	733,83	728,8		0,69	1,9	12,5	A	734,9	6,2	-0,8	PASA
Nivel E	950	962,46	970,21	968,79	967,2		0,43	1,8	12,5	A	976,3	6,2	-0,9	PASA
CON AJUSTES														
	Target													
Nivel A	10	10,43	10,65	10,43	10,5	mg/dl	1,21	5,0	50	A	11	22,7	-4,5	PASA
Nivel B	245	255,3	254,48	254,07	254,6		0,25	3,9	12,5	A	251,6	6,2	1,2	PASA
Nivel C	480	490,3	492,27	489,46	490,7		0,29	2,2	12,5	A	492,3	6,2	-0,3	PASA
Nivel D	715	727,77	728,88	720,16	725,6		0,65	1,5	12,5	A	733	6,2	-1,0	PASA
Nivel E	950	960,7	964,89	961,63	962,4		0,23	1,3	12,5	A	973,7	6,2	-1,2	PASA

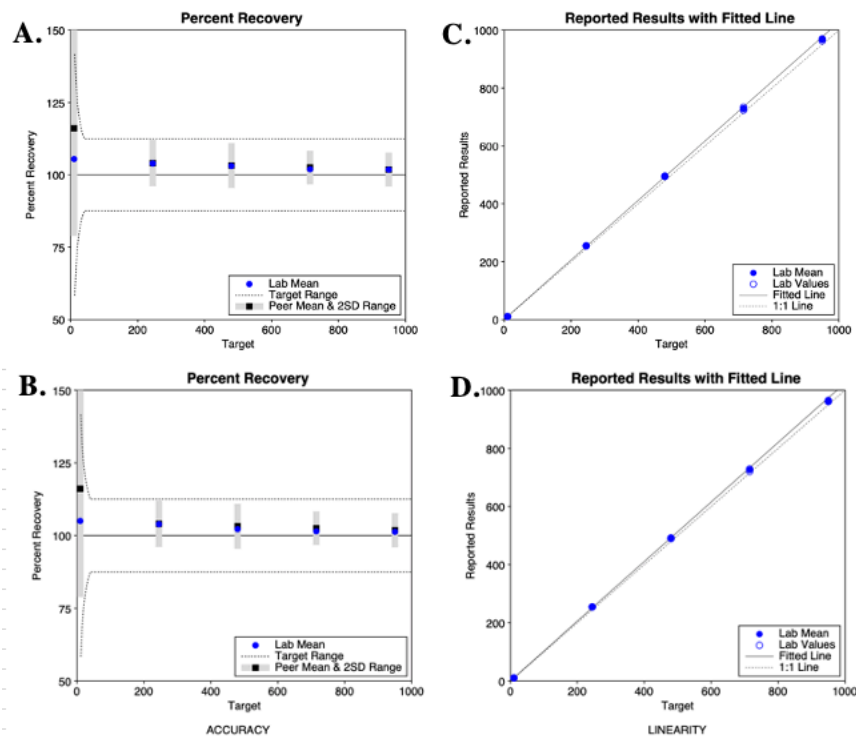


Figura 2. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Triglicéridos sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

Nitrógeno Ureico

Cuadro 6. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para nitrógeno ureico sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor A=1,015 y B=0,0. Eta=2 mg/dl o 9 % (CLIA).

BUN		Resultados					Exactitud					Linealidad			
		SIN AJUSTES													
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	5	5,11	5,22	5,11	5,15	mg/dl	1,23	3,0	20	A	5,25	9,5	-1,9	PASA	
Nivel B	37,5	38,66	38,82	38,37	38,62		0,59	3,0	4,5	B	38,45	2,3	0,4	PASA	
Nivel C	70	72,01	72,34	71,6	71,98		0,52	2,8	4,5	B	71,65	2,3	0,5	PASA	
Nivel D	102,5	104,46	104,73	103,93	104,37		0,39	1,8	4,5	A	104,85	2,3	-0,5	PASA	
Nivel E	135	138,68	139,08	137,75	138,5		0,49	2,6	4,5	B	138,06	2,3	0,3	PASA	
CON AJUSTES															
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	5	5,22	5,29	5,04	5,18	mg/dl	2,49	3,6	20	A	5,33	9,4	-2,8	PASA	
Nivel B	37,5	38,67	38,93	39,2	38,93		0,68	3,8	4,5	B	38,67	2,3	0,7	PASA	
Nivel C	70	72,62	71,97	72,44	72,34		0,46	3,3	4,5	B	72,01	2,3	0,5	PASA	
Nivel D	102,5	105,14	104,45	105,28	104,96		0,42	2,4	4,5	B	105,35	2,3	-0,4	PASA	
Nivel E	135	137,49	138,23	137,58	137,77		0,29	2,1	4,5	A	138,69	2,3	-0,7	PASA	

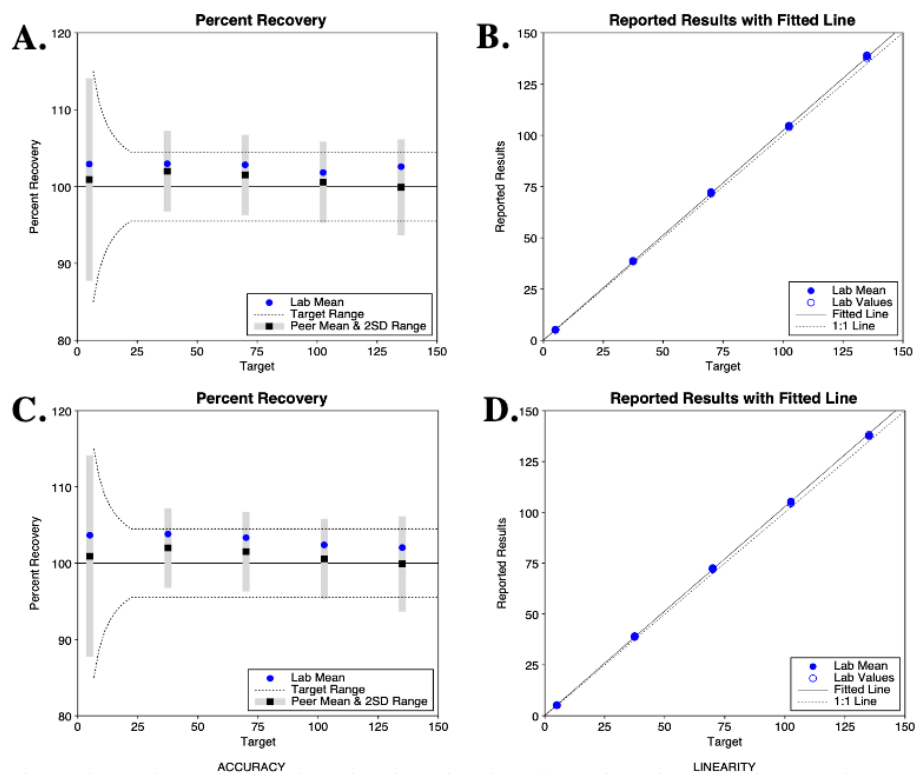


Figura 3. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Nitrógeno Ureico sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

Creatinina

Creatinina no posee ajustes de factor de correlación por lo que los resultados mostrados son sin ajuste, con los factores de fabricante.

Cuadro 7. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para creatinina sin ajuste de factor de correlación $A=1$ y $B=0,0$. $E_{ta}=0,3$ mg/dl o 15 % (CLIA).

CREA	Resultados					Exactitud				Linealidad				
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% E_{ta}	Clasif	Linear Fit	25% E_{ta}	Error de no linealidad %	Linealidad
SIN AJUSTES														
Nivel A	0,2	0,133	0,133	0,14	0,14	mg/dl	3,54	-30,0	7,5	A	0,15	50,0	-6,7	PASA
Nivel B	6,2	6,303	6,244	6,311	6,29		0,75	1,5	7,5	A	6,22	3,8	1,1	PASA
Nivel C	12,2	12,347	12,302	12,384	12,34		0,47	1,1	7,5	A	12,29	3,8	0,4	PASA
Nivel D	18,08	18,219	18,152	18,361	18,24		0,81	0,9	7,5	A	18,36	3,8	-0,7	PASA
Nivel E	24,2	24,158	24,218	24,211	24,2		0,02	0,0	7,5	A	24,43	3,8	-0,9	PASA

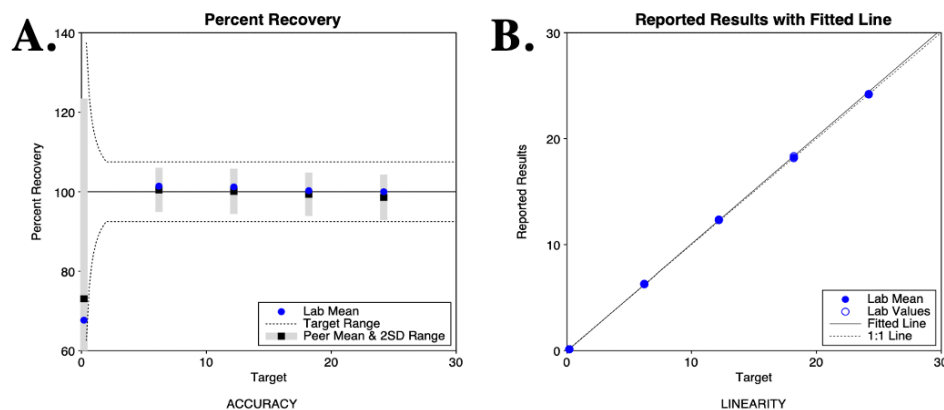


Figura 4. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Creatinina sin ajuste (A) y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (B).

Colesterol

Cuadro 8. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para colesterol sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,035$ y $B=0,0$. $E_{Ta}=10$ mg/dl o 10 % (CLIA).

CHOL		Resultados				Exactitud					Linealidad				
		SIN AJUSTES													
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% E_{Ta}	Clasif	Linear Fit	25% E_{Ta}	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	40	38,8	38,7	38,7	38,7	mg/dl	0,15	-3,2	12,5	A	38,8	6,4	-0,3	PASA	
Nivel B	155	153,2	152,9	152,6	152,9		0,20	-1,4	5	A	153,4	2,5	-0,3	PASA	
Nivel C	270	268,5	266,6	267	267,4		0,37	-1,0	5	A	267,9	2,5	-0,2	PASA	
Nivel D	385	384,5	382,6	383,4	383,5		0,25	-0,4	5	A	382,4	2,5	0,3	PASA	
Nivel E	500	498,8	493,2	494,2	495,4		0,60	-0,9	5	A	496,9	2,5	-0,3	PASA	
		CON AJUSTES													
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% E_{Ta}	Clasif	Linear Fit	25% E_{Ta}	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	40	39,6	39,6	39,5	39,6	mg/dl	0,15	-1,0	12,5	A	39,3	6,4	0,8	PASA	
Nivel B	155	157,9	156,4	156	156,8		0,64	1,2	5	A	156,5	2,5	0,2	PASA	
Nivel C	270	274,1	271	273,7	272,9		0,62	1,1	5	A	273,8	2,5	-0,3	PASA	
Nivel D	385	394,8	391,3	390,4	392,2		0,59	1,9	5	A	391,0	2,5	0,3	PASA	
Nivel E	500	507,8	507,4	507,8	507,7		0,05	1,5	5	A	508,2	2,5	-0,1	PASA	

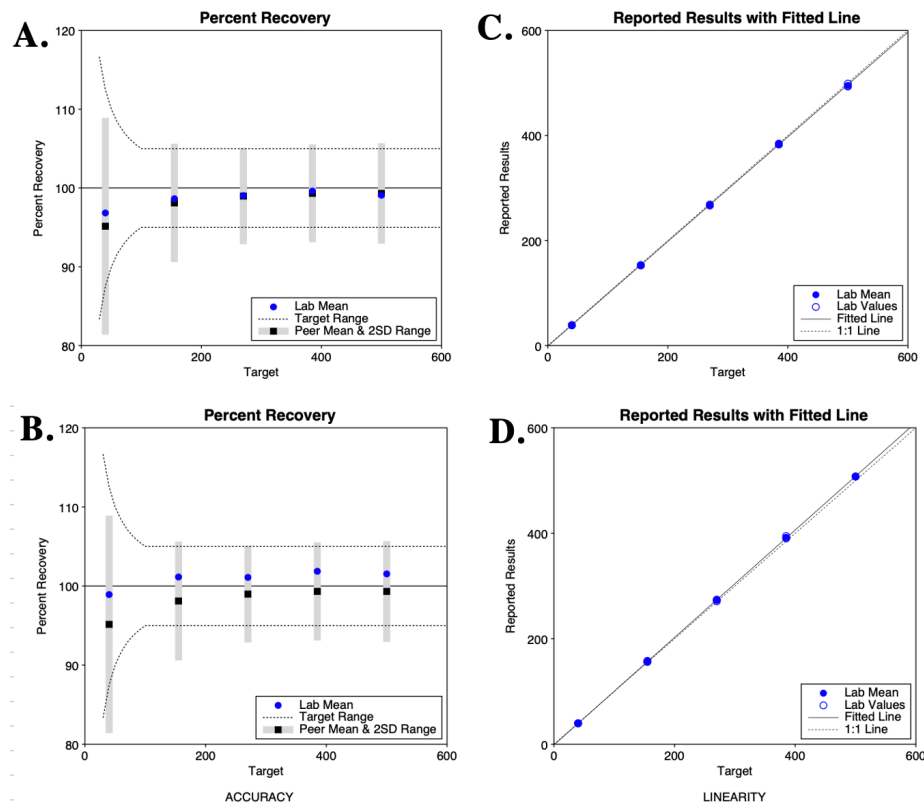


Figura 5. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Colesterol sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

Ácido Úrico

Cuadro 9. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para ácido úrico sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,035$ y $B=0,0$. $E_{ta}=0,35$ mg/dl o 17 % (CLIA).

URICO		Resultados					Exactitud				Linealidad				
		SIN AJUSTES													
Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad		
Nivel A	2	2,1	2,13	2,11	2,11	mg/dl	0,72	5,5	8,75	B	2,10	4,25	0,5	PASA	
Nivel B	7	7	6,99	7,06	7,02		0,54	0,3	8,5	A	7,07	4,25	-0,7	PASA	
Nivel C	12	11,92	11,94	12,02	11,96		0,44	-0,3	8,5	A	12,03	4,25	-0,6	PASA	
Nivel D	17	16,98	17,16	17,22	17,12		0,73	0,7	8,5	A	17,00	4,25	0,7	PASA	
Nivel E	22	21,83	21,78	22,06	21,89		0,68	-0,5	8,5	A	21,97	4,25	-0,4	PASA	
		CON AJUSTES													
Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad		
Nivel A	2	2,15	2,16	2,17	2,16	mg/dl	0,46	8,0	8,8	B	2,14	4,25	0,9	PASA	
Nivel B	7	7,19	7,15	7,24	7,19		0,63	2,7	8,5	A	7,26	4,25	-1,0	PASA	
Nivel C	12	12,27	12,25	12,26	12,26		0,08	2,2	8,5	A	12,37	4,25	-0,9	PASA	
Nivel D	17	17,58	17,68	17,68	17,65		0,33	3,8	8,5	A	17,49	4,25	0,9	PASA	
Nivel E	22	22,6	22,44	22,61	22,55		0,42	2,5	8,5	A	22,6	4,25	-0,2	PASA	

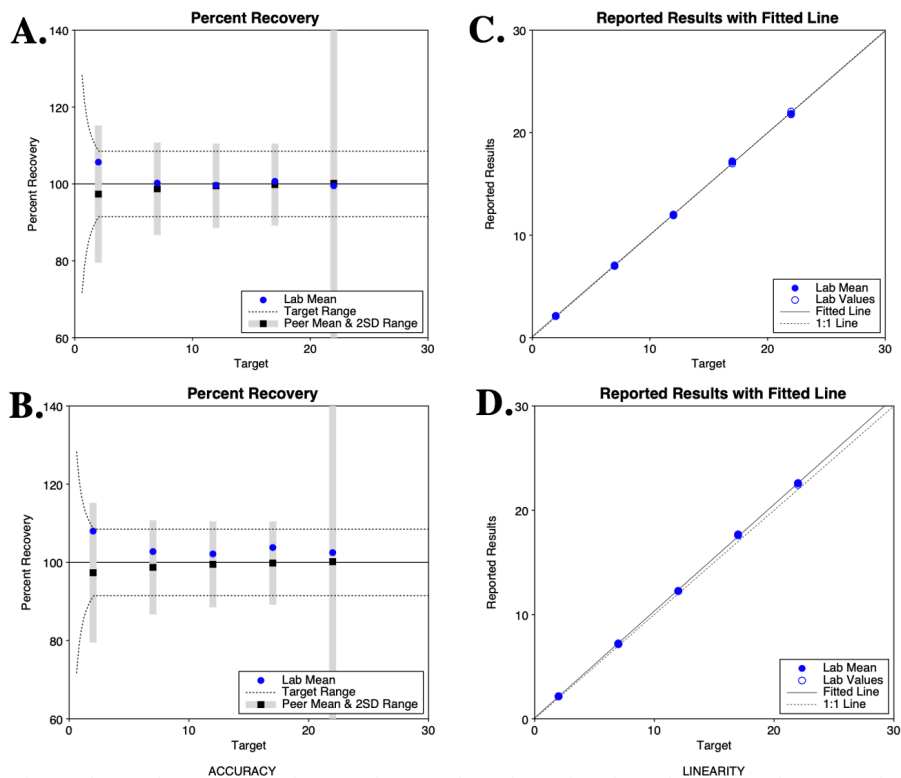


Figura 6. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Ácido Úrico sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

ALT

Cuadro 10. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Alanina-Aminotransferasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,094$ y $B=0,0$. $E_{ta}=10$ U/L o 20 % (CLIA).

ALT		Resultados					Exactitud				Linealidad			
		SIN AJUSTES												
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% E_{Ta}	Clasif	Linear Fit	25% E_{ta}	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	2	3,1	2,3	3	2,8	U/L	15,57	40,0	250	A	2,3	108,8	21,7	PASA
Nivel B	15	15	14,8	14,9	14,9		0,67	-0,7	33,5	A	15,2	16,5	-2,0	PASA
Nivel C	125	122,9	122,7	123,2	122,9		0,20	-1,7	10	A	124,2	5,0	-1,0	PASA
Nivel D	246	242,6	245,8	244,3	244,2		0,66	-0,7	10	A	244,2	5,0	0,0	PASA
Nivel E	366	358,3	364,1	363,8	362,1		0,90	-1,1	10	A	363,2	5,0	-0,3	PASA
Nivel F	481	481,4	483,6	482,3	482,4		0,19	0,3	10	A	477,3	5,0	1,1	PASA
CON AJUSTES														
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% E_{Ta}	Clasif	Linear Fit	25% E_{ta}	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	2	3,3	2,8	3,3	3,1	U/L	9,31	55,0	250	A	2,6	96,3	19,2	PASA
Nivel B	15	15,9	16,6	16,1	16,2		2,23	8,0	33,5	A	16,7	15,0	-3,0	PASA
Nivel C	125	135	134,6	135,6	135,1		0,37	8,1	10	B	136,1	5,0	-0,7	PASA
Nivel D	246	266,5	263,8	264,5	264,9		0,53	7,7	10	B	267,4	5,0	-0,9	PASA
Nivel E	366	400,8	396,8	395,1	397,6		0,74	8,6	10	B	397,6	5,0	0,0	PASA
Nivel F	481	528,5	527,6	527,6	527,9		0,10	9,8	10	B	522,4	5,0	1,1	PASA

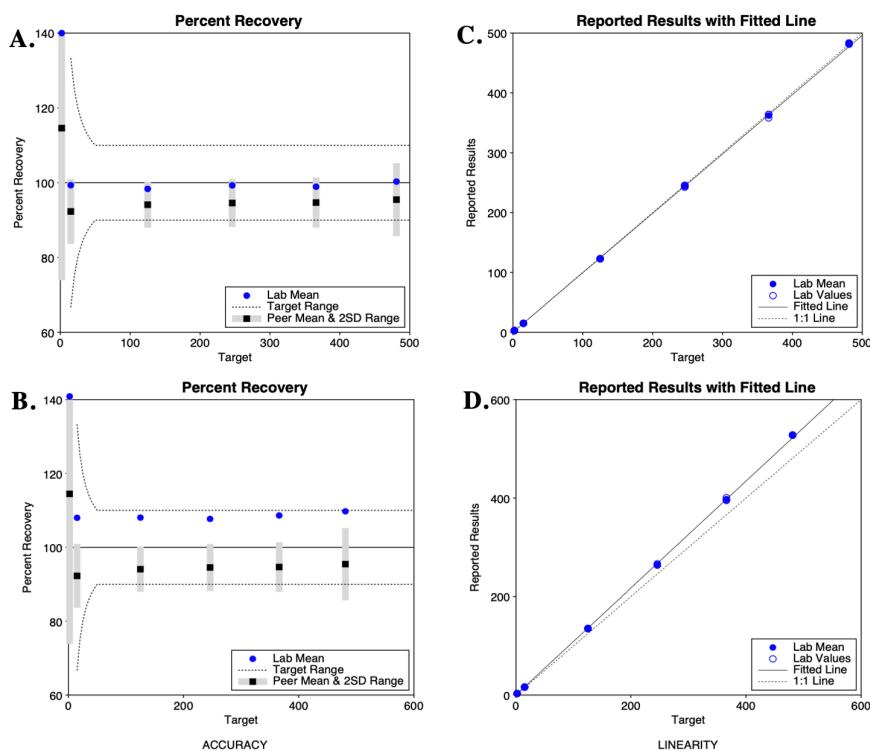


Figura 7. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Alanina-Aminotransferasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

AST

Cuadro 11. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Aspartato-Aminotransferasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor A=1,12 y B=0,0. Eta=10 U/L o 20 % (CLIA).

AST		Resultados					Exactitud				Linealidad				
		SIN AJUSTES													
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	4	3,9	3,7	3,8	3,8	U/L	2,63	-5,0	125	A	2,6	96,2	46,2	PASA	
Nivel B	23	20,8	21,7	20,8	21,1		2,46	-8,3	21,7	A	20,8	12,0	1,4	PASA	
Nivel C	192	179,3	178	178,9	178,7		0,37	-6,9	10	B	182,8	5,0	-2,2	PASA	
Nivel D	380	355,8	354,4	352,8	354,3		0,42	-6,8	10	B	363,0	5,0	-2,4	PASA	
Nivel E	566	551,8	555,9	556,9	554,9		0,49	-2,0	10	A	541,3	5,0	2,5	PASA	
Nivel F	750	709,7	702,5	712,6	708,3		0,73	-5,6	10	B	717,7	5,0	-1,3	PASA	
CON AJUSTES															
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	4	4,4	3,7	3,8	4	U/L	9,46	0,0	125	A	2,7	92,6	48,1	PASA	
Nivel B	23	24,2	24,6	24,2	24,3		0,95	5,7	21,7	A	23	10,9	5,7	PASA	
Nivel C	192	199,5	197,7	199,1	198,8		0,48	3,5	10	A	203,9	5,0	-2,5	PASA	
Nivel D	380	395,1	399	397,2	397,1		0,49	4,5	10	A	405,2	5,0	-2,0	PASA	
Nivel E	566	622	622,7	616,8	620,5		0,52	9,6	10	B	604,3	5,0	2,7	PASA	
Nivel F	750	786,2	794,4	791	790,5		0,52	5,4	10	B	801,3	5,0	-1,3	PASA	

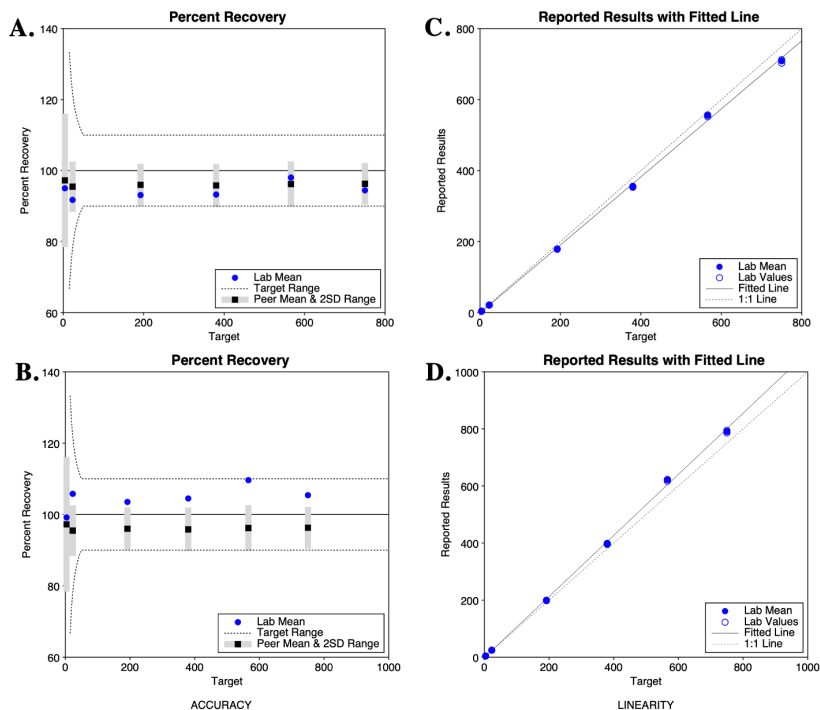


Figura 8. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Aspartato-Aminotransferasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

CK

Cuadro 12. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Creatina-Kinasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,1356$ y $B=0,0$. $E_{ta}=15$ U/L o 30 % (CLIA).

CK		Resultados				Exactitud				Linealidad				
SIN AJUSTES														
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	8	10	8	7	8,3	U/L	18,40	3,8	93,8	A	8,6	43,6	-3,5	PASA
Nivel B	60	58	58	59	58,3		0,99	-2,8	15	A	58,1	7,5	0,3	PASA
Nivel C	517	491	498	496	495		0,73	-4,3	15	A	493,2	7,5	0,4	PASA
Nivel D	1007	963	962	958	961		0,28	-4,6	15	A	959,8	7,5	0,1	PASA
Nivel E	1492	1412	1414	1420	1415,3		0,29	-5,1	15	A	1421,7	7,5	-0,5	PASA
Nivel F	1943	1845	1842	1859	1848,7		0,49	-4,9	15	A	1851,1	7,5	-0,1	PASA
CON AJUSTES														
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	8	9	8	8	8,3	U/L	6,96	3,8	93,8	A	8,8	42,6	-5,7	PASA
Nivel B	60	67	66	66	66,3		0,87	10,5	15	B	65,7	7,5	0,9	PASA
Nivel C	517	562	565	563	563,3		0,27	9,0	15	B	565,3	7,5	-0,4	PASA
Nivel D	1007	1099	1092	1096	1095,7		0,32	8,8	15	B	1100,9	7,5	-0,5	PASA
Nivel E	1492	1626	1620	1615	1620,3		0,34	8,6	15	B	1631,1	7,5	-0,7	PASA
Nivel F	1943	2103	2087	2120	2103,3		0,78	8,3	15	B	2124,2	7,5	-1,0	PASA

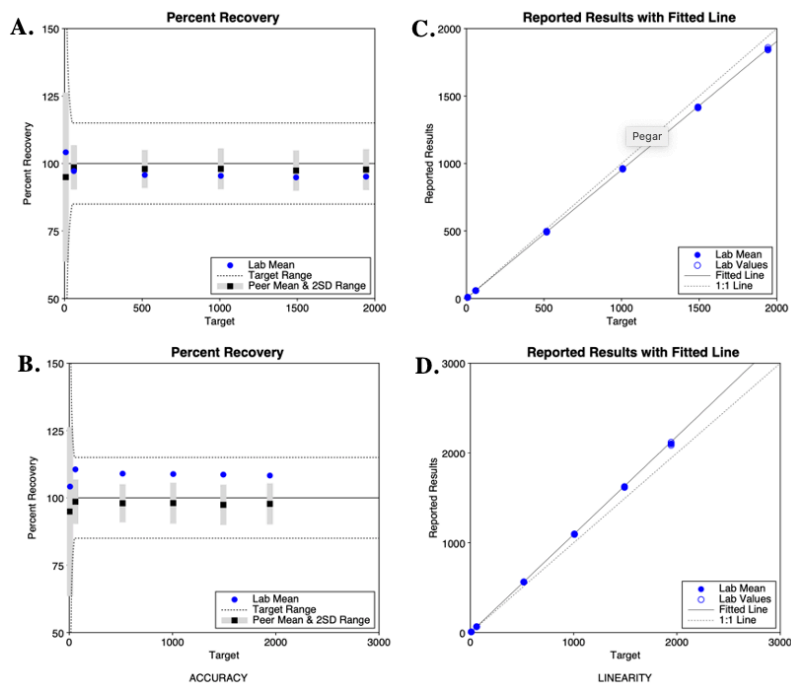


Figura 9. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Creatina-Kinasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

ALP

Cuadro 13. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Fosfatasa Alcalina sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,2935$ y $B=-28,25$. $E_{ta}=10$ U/L o 30 % (CLIA).

ALP		Resultados				Exactitud				Linealidad				
		SIN AJUSTES												
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	7	7	7	7	7	U/L	0,00	0,0	71,4	A	7,2	34,7	-2,8	PASA
Nivel B	46	47	47	47	47		0,00	2,2	15	A	46,7	7,5	0,6	PASA
Nivel C	399	403	401	408	404		0,89	1,3	15	A	404,1	7,5	0,0	PASA
Nivel D	786	792	793	788	791		0,33	0,6	15	A	796,0	7,5	-0,6	PASA
Nivel E	1167	1177	1175	1180	1177		0,21	0,9	15	A	1181,8	7,5	-0,4	PASA
Nivel F	1544	1573	1555	1567	1565		0,59	1,4	15	A	1563,6	7,5	0,1	PASA
		CON AJUSTES												
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A*	7	----	----	----	----	U/L	----	----	----	----	----	----	----	----
Nivel B	46	33	33	32	32,7		1,77	-28,9	15	D	32,8	7,6	-0,3	PASA
Nivel C	399	493	501	496	496,7		0,81	24,5	15	D	495,3	7,5	0,3	PASA
Nivel D	786	1005	1000	1016	1007		0,81	28,1	15	D	1002,4	7,5	0,5	PASA
Nivel E	1167	1502	1493	1489	1494,7		0,45	28,1	15	D	1501,5	7,5	-0,5	PASA
Nivel F	1544	2007	2001	2005	2004,3		0,15	29,8	15	D	1995,5	7,5	0,4	PASA

*Con ajustes, el Nivel A para ALP daba valores negativos por lo que no se incluyeron los resultados en el cuadro de resultados.

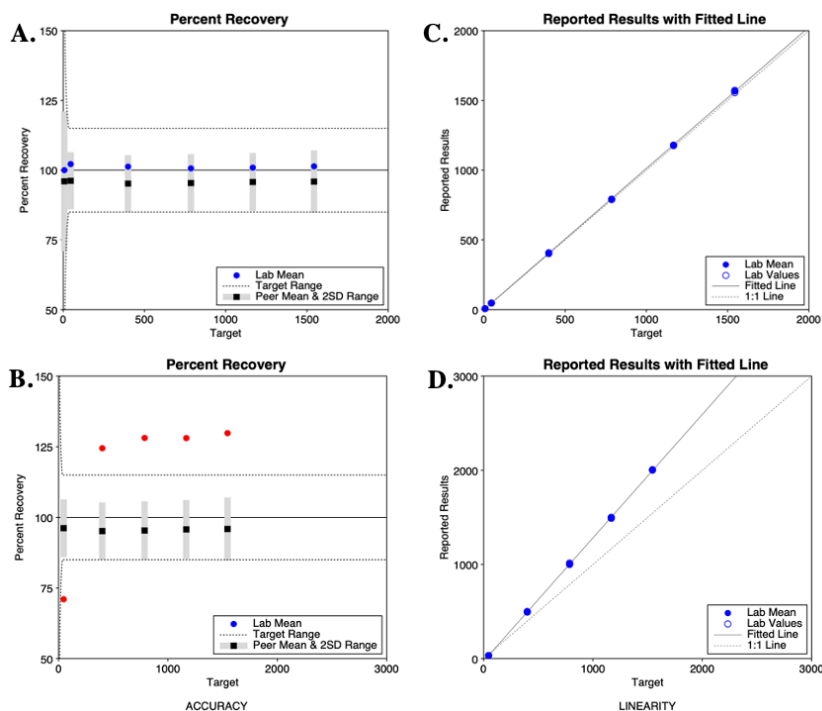


Figura 10. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Fosfatasa Alcalina sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

LDH

Cuadro 14. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Lactato Deshidrogenasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=1,0255$ y $B=0,0$. $E_{ta}=25$ U/L o 20 % (CLIA).

LDH		Resultados				Exactitud				Linealidad				
SIN AJUSTES														
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% E_{Ta}	Clasif	Linear Fit	25% E_{ta}	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	8	7	6	6	6,3	U/L	9,16	-21,3	156,3	A	8,2	78,1	-23,2	PASA
Nivel B	41	35	35	36	35,3		1,64	-13,9	30,5	A	36,0	17,4	-1,9	PASA
Nivel C	330	282	285	285	284		0,61	-13,9	10	C	279,9	5,0	1,5	PASA
Nivel D	634	536	531	536	534,3		0,54	-15,7	10	D	536,4	5,0	-0,4	PASA
Nivel E	920	787	787	784	786		0,22	-14,6	10	C	777,7	5,0	1,1	PASA
Nivel F	1195	998	992	996	995,3		0,31	-16,7	10	D	1009,8	5,0	-1,4	PASA
CON AJUSTES														
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV%	% Error	50% E_{Ta}	Clasif	Linear Fit	25% E_{ta}	Error de no linealidad %	Linealidad
Nivel A	8	8	6	6	6,7	U/L	17,23	-16,3	156,3	A	9,4	66,5	-28,7	PASA
Nivel B	41	36	36	35	35,7		1,62	-12,9	30,5	A	38,2	16,4	-6,5	PASA
Nivel C	330	297	298	296	297		0,34	-10,0	10	B	290,6	5,0	2,2	PASA
Nivel D	634	548	553	552	551		0,48	-13,1	10	C	556,1	5,0	-0,9	PASA
Nivel E	920	810	800	816	808,7		1,00	-12,1	10	C	805,9	5,0	0,3	PASA
Nivel F	1195	1025	1023	1024	1024		0,10	-14,3	10	C	1046,1	5,0	-2,1	PASA

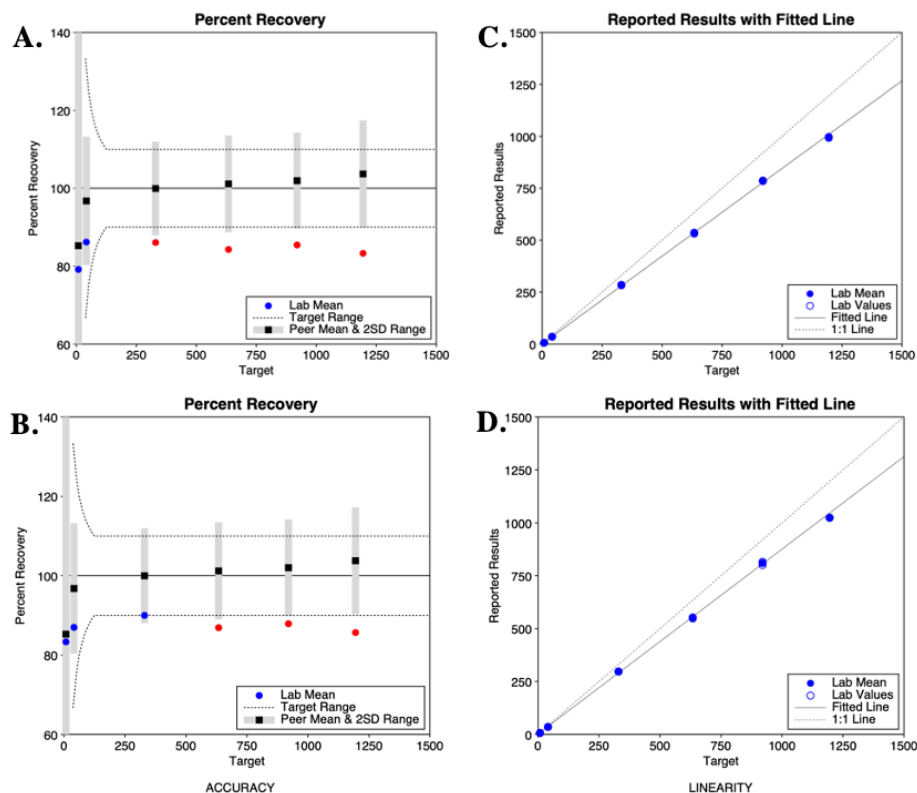


Figura 11. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Lactato Deshidrogenasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

GGT

Cuadro 15. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Gamaglutamil-transferasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor A=1,14 y B=0,0. Eta=10 U/L o 20 % (CLIA).

GGT	Resultados					Exactitud				Linealidad				
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad
SIN AJUSTES														
Nivel A	6	5,5	5,2	5,6	5,4	U/L	3,85	-10,0	83,3	A	5,7	43,9	-5,3	PASA
Nivel B	37	37,8	37,4	37,7	37,6		0,55	1,6	13,5	A	37,1	6,7	1,3	PASA
Nivel C	315	321	320,9	323,4	321,8		0,44	2,2	10	A	319,5	5,0	0,7	PASA
Nivel D	617	628,5	630,4	624,3	627,7		0,50	1,7	10	A	626,2	5,0	0,2	PASA
Nivel E	907	912,4	912	911	911,8		0,08	0,5	10	A	920,7	5,0	-1,0	PASA
Nivel F	1180	1231,7	1207	1190,8	1209,8		1,70	2,5	10	A	1198,0	5,0	1,0	PASA
CON AJUSTES														
Nivel A	6	6,4	6,8	6,1	6,4	U/L	5,49	6,7	83,3	A	6,9	36,2	-7,2	PASA
Nivel B	37	42,8	42,6	43	43		0,47	16,2	13,5	C	43,3	5,8	-0,7	PASA
Nivel C	315	371,8	367,4	367,6	367,6		0,68	16,7	10	D	369,5	5,0	-0,5	PASA
Nivel D	617	739,2	722,5	732,6	732,6		1,15	18,7	10	D	723,9	5,0	1,2	PASA
Nivel E	907	1057	1054,2	1048,6	1048,6		0,41	15,6	10	D	1064	5,0	-1,5	PASA
Nivel F	1180	1410,6	1369,2	1368,3	1368,3		1,77	16,0	10	D	1385	5,0	-1,2	PASA

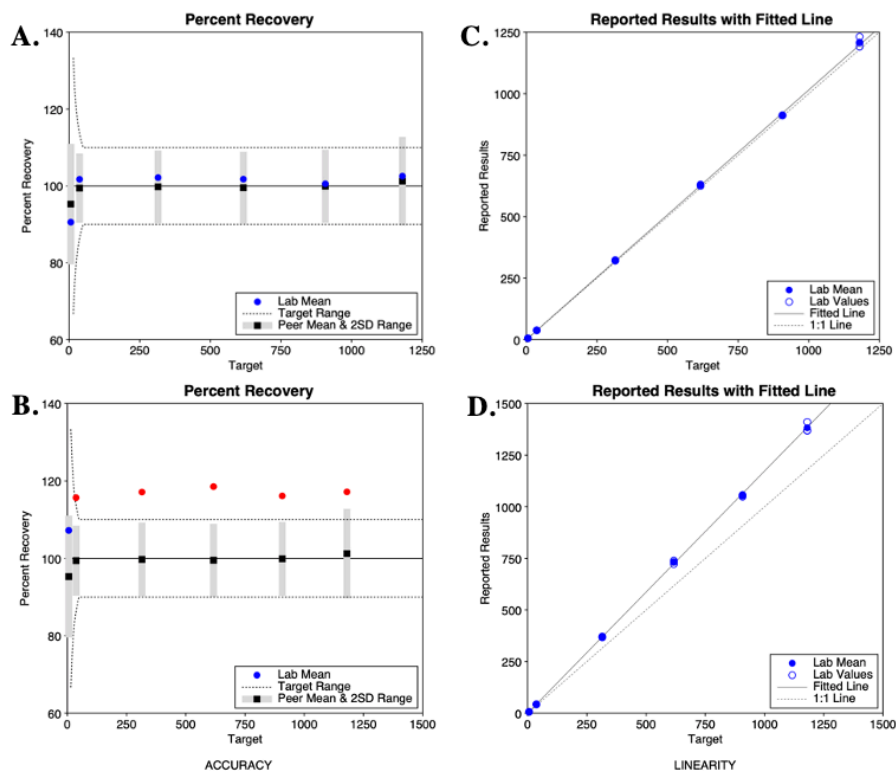


Figura 12. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Gamaglutamil-transferasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

AMY

Cuadro 16. Resultados de la estimación de la exactitud y linealidad, para Amilasa sin ajuste de factor de correlación y con ajuste de factor $A=0,88$ y $B=7,26$. $E_{ta}=10$ U/L o 30 % (CLIA).

AMY		Resultados					Exactitud				Linealidad				
		SIN AJUSTES													
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	11	15	14	14	14,3	U/L	4,04	30,0	45,5	B	14,7	17,0	-2,7	PASA	
Nivel B	64	83	83	85	83,7		1,38	30,8	15	F	82,8	7,5	1,1	PASA	
Nivel C	541	690	690	693	691		0,25	27,7	15	D	695,5	7,5	-0,6	PASA	
Nivel D	1059	1349	1348	1348	1348,3		0,04	27,3	15	D	1360,8	7,5	-0,9	PASA	
Nivel E	1567	2008	1988	2012	2002,7		0,64	27,8	15	D	2013,3	7,5	-0,5	PASA	
Nivel F	2067	2625	2632	2625	2627,3		0,15	27,1	15	D	2655,6	7,5	-1,1	PASA	
CON AJUSTES															
	Target	Réplica 1	Réplica 2	Réplica 3	Promedio	Unid.	CV %	% Error	50% ETa	Clasif	Linear Fit	25% Eta	Error de no linealidad %	Linealidad	
Nivel A	11	19	20	20	19,7	U/L	2,93	79,1	45,5	D	20,1	12,4	-2,0	PASA	
Nivel B	64	80	82	81	81		1,23	26,6	15	D	79,9	7,5	1,4	PASA	
Nivel C	541	623	614	613	616,7		0,89	14,0	15	B	617,8	7,5	-0,2	PASA	
Nivel D	1059	1203	1206	1193	1200,7		0,57	13,4	15	B	1202	7,5	-0,1	PASA	
Nivel E	1567	1745	1749	1758	1750,7		0,38	11,7	15	B	1775	7,5	-1,4	PASA	
Nivel F	2067	2339	2323	2318	2326,7		0,47	12,6	15	B	2339	7,5	-0,5	PASA	

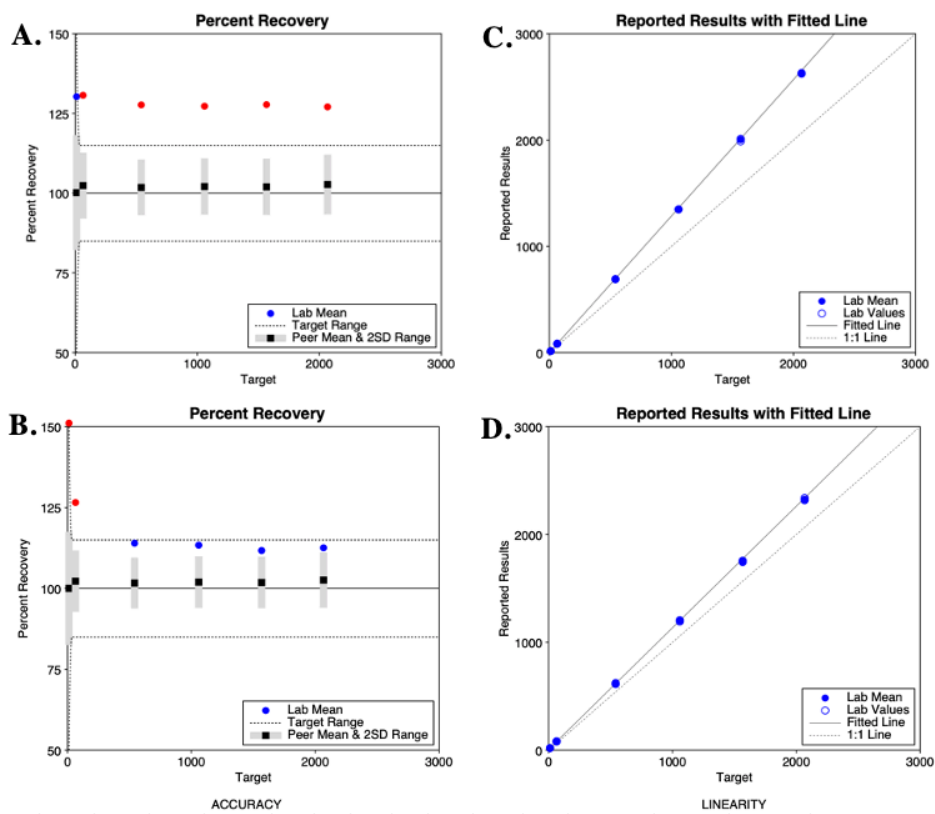


Figura 13. Gráfico de exactitud para la verificación de la calibración de Amilasa sin ajuste (A) y con ajuste (B), y verificación de linealidad y del intervalo analítico cuantificable sin ajuste (C) y con ajuste (D).

Resumen de los resultados

Cuadro 17. Resumen de los resultados para verificación de la calibración y linealidad de los 13 parámetros dentro del alcance del estudio.

Analito		Verificación de Calibración		Verificación de Linealidad	
		Sin Ajuste	Con Ajuste	Sin Ajuste	Con Ajuste
1	GLU	A	A	PASA	PASA
2	TRIG	A	A	PASA	PASA
3	BUN	B	B	PASA	PASA
4	CREA	A	----	PASA	----
5	CHOL	A	A	PASA	PASA
6	URICO	B	B	PASA	PASA
7	ALT	A	B	PASA	PASA
8	AST	B	B	PASA	PASA
9	CK	A	B	PASA	PASA
10	ALP	A	D	PASA	PASA
11	LDH	D	C	PASA	PASA
12	GGT	A	D	PASA	PASA
13	AMY	F	D	PASA	PASA

Para observación del efecto del ajuste sobre el sesgo para la verificación de la calibración, se codificó un patrón de valores del 1 al 5 para las categorías de la A a la F mostradas en el cuadro anterior, siendo A=1, B=2, C=3, D=4, F=5 (Ver figura 14).

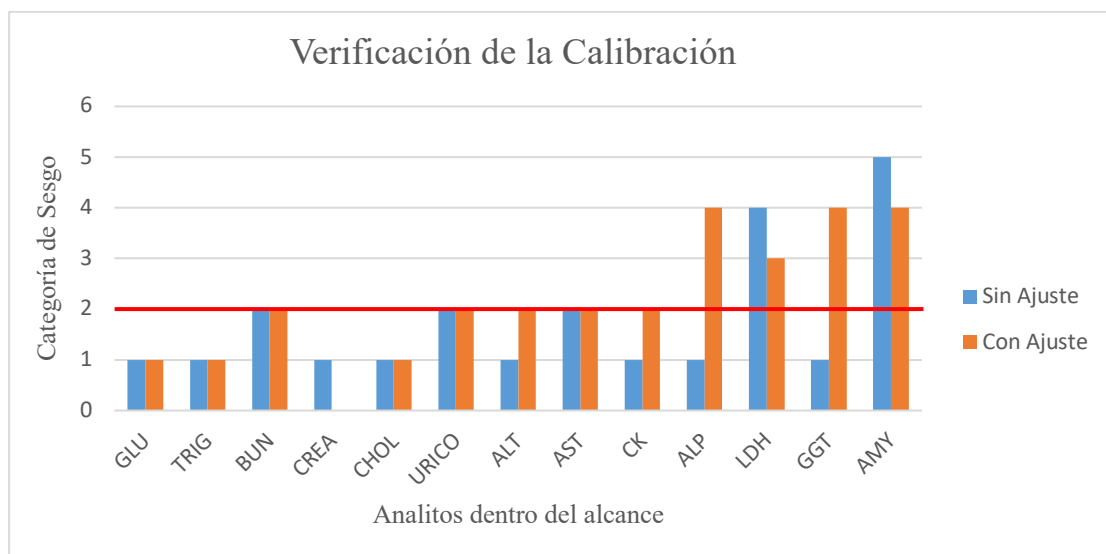


Figura 14. Resumen de categoría de sesgo (A=1, B=2, C=3, D=4, F=5) para cada analito dentro del alcance del estudio con y sin ajustes del factor de correlación.

Cuadro 18. Resumen del intervalo de medición analítica verificado con y sin ajustes del factor de correlación en comparación con el reportado por fabricante.

Analito	Intervalo de Fabricante	Intervalo Verificado sin ajustes	Intervalo verificado con ajustes	Unidades
GLU	10 - 800	25 - 716	25 - 726	mg/dl
TRIG	10 - 1000	11 - 967	11 - 962	mg/dl
BUN	2 - 130	5,1 - 138,5	5,2 - 137,8	mg/dl
CREA	0,2 - 25	0,1 - 24,2	----	mg/dl
CHOL	25 - 700	39 - 495	40 - 508	mg/dl
URICO	1,5 - 30	2,1 - 21,9	2,2 - 22,6	mg/dl
ALT	3-500	3-482	3-528	U/L
AST	3 - 1000	4-708	4-791	U/L
CK	10 - 2000	8 - 1849	8 - 2103	U/L
ALP	5 - 1500	7 - 1565	33 - 2004	U/L
LDH	25 - 1200	6 - 995	7 - 1024	U/L
GGT	3 - 1200	5 - 1210	6 - 1383	U/L
AMY	10 - 2000	14 - 2627	20 - 2327	U/L

Control Interno Interlaboratorio BIORAD (Unity)

Cuadro 19. Porcentaje de error para las diferencia de medias del control interno BIORAD del laboratorio en comparación con la media del grupo par para la misma metodología sin y con calibrador Ref.66300 del programa de control interlaboratorial Unity.

Analito	Control	Media de laboratorio	Unid.	Sin calibrar		Calibrado (Ref.66300)	
				Media	% Error	Media	% Error
ALT	Nivel 2	87,95	U/L	79,79	10,23	92,32	-4,73
	Nivel 3	179,89		161,8	11,18	188,2	-4,42
AST	Nivel 2	110,61		91,71	20,61	115,2	-3,98
	Nivel 3	228,62		200,8	13,85	251,2	-8,99
CK	Nivel 2	273,4		249,6	9,54	267,5	2,21
	Nivel 3	639,3		565,8	12,99	554,2	15,36
AMY	Nivel 2	135,9		115,8	17,36	135,4	0,37
	Nivel 3	279,0		245,7	13,55	----	----
GGT	Nivel 2	76,84		66,57	15,43	82,35	-6,69
	Nivel 3	125,17		108,9	14,94	135,7	-7,76
LDH	Nivel 2	156,4		136,1	14,92	168,3	-7,07
	Nivel 3	397,3		342,2	16,10	425,5	-6,63
ALP	Nivel 2	160,0		150,6	6,24	173,0	-7,51
	Nivel 3	362,7		306,0	18,53	352,5	2,89

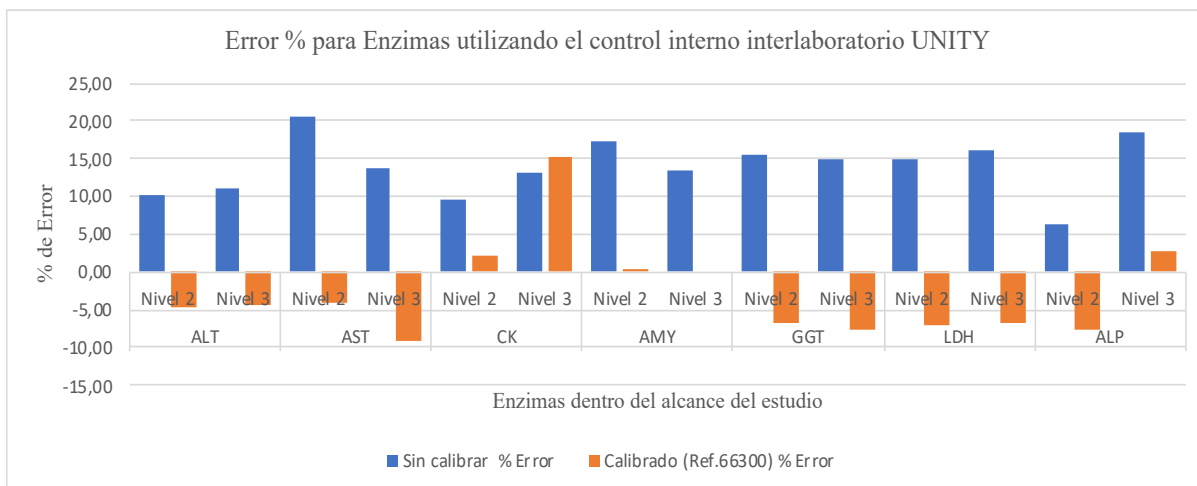


Figura 15. Porcentaje de error para las diferencias de las medias del control interno interlaboratorio (Unity) para enzimas, utilizando como referencia la media del grupo para la misma metodología sin y con el calibrador de enzimas Ref. 66300 (Master Calibrator)

Discusión

La verificación de métodos analíticos es un proceso que se realiza en los diferentes métodos de ensayo, previo a su utilización para brindar resultados de pacientes, con el fin de evaluar el desempeño analítico y que los ensayos cumplan con los requerimientos del fabricante y del laboratorio (Nichols & Makowski, 2009).

Existen varias normas internacionales de calidad que respaldan el requisito de verificación de métodos, por ejemplo: La ISO (International Organization for Standardization) recomienda la verificación de métodos como parte del sistema de gestión de calidad de los laboratorios clínicos, la CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute) tiene una serie de pautas relacionadas con la validación como la verificación de métodos. Algunos entes de acreditación publican guías como la del CAP (Colegio americano de patólogos) al igual que la Joint Commission, y la CPA (U.K. Clinical Pathology Accreditation), o regulaciones regionales en Estados Unidos como la de CLIA'88 (Clinical Laboratory Improvement Amendments of 1988), las cuales describen los requerimientos de verificación de métodos analíticos (Nichols & Makowski, 2009).

En general, las instituciones, guías y entes regulatorios citados, concuerdan en los principales protocolos que deben ser abordados dentro del proceso de verificación de métodos, dentro de los cuales incluye: exactitud o veracidad, precisión, verificación de intervalo reportable o linealidad, y la aplicación o verificación del intervalo de referencia sobre la población del laboratorio. Además, todas las organizaciones internacionales en sus guías y estándares mencionan la necesidad de incorporar el protocolo de verificación de la calibración, incluso el CAP, CLIA y la Joint Commission mencionan la necesidad de aplicar este protocolo de verificación cada 6 meses como mínimo (Nichols & Makowski, 2009).

El término linealidad, no es explícitamente utilizado en las guías de la CLSI o del CAP referentes a verificación de métodos, en su lugar se utilizan términos como: verificación del intervalo de medición analítica (AMR, por sus siglas en inglés), en la guía para química y toxicología del CAP del año 2017, se define el intervalo de medición analítica como:

“El intervalo de valores de analito que un método puede medir directamente en la muestra sin ninguna dilución, concentración u otro pretratamiento que no forme parte del proceso de ensayo habitual. La validación del AMR es el proceso de confirmar que el sistema de ensayo recuperará correctamente la concentración o actividad del analito sobre la AMR”.

Para CLIA, el término “verificación de la calibración” hace referencia a dos procesos distintos: el primero consiste en la verificación de la calibración correcta del método, y el segundo hace referencia a la verificación del intervalo de medición analítica. Para el CAP, el término verificación de calibración tienen un significado más restrictivo (College of American Pathologists, 2017):

“El proceso de confirmar que los ajustes de calibración actuales siguen siendo válidos para un método. Si la verificación de la calibración confirma que los ajustes de calibración actuales son válidos, no es necesario realizar una calibración completa o una recalibración del método”.

La verificación de la ARM implica que los valores medidos de las muestras de prueba frente a su concentración real (o esperada) o concentraciones relativas debe ser lineal dentro de los criterios de aceptación definidos sobre el AMR. Solo se deben informar los valores medidos que se encuentran dentro del AMR (o que pueden llevarse al AMR mediante la dilución o concentración de la muestra). Los valores que quedan fuera del AMR se pueden informar como "menores que" o "mayores que" los límites del AMR (College of American Pathologists, 2017).

Tal como lo expresan las guías citadas, es importante entonces, aplicar un protocolo de verificación del desempeño analítico de los métodos a utilizar en un laboratorio clínico, previo a su uso para reportar muestras de pacientes. Además, es importante incluir la verificación de la linealidad o AMR para lo cual contamos con la guía de la CLSI EP06-A, y la para verificación de la calibración contamos con las guías del CAP para química y toxicología.

En Costa Rica los laboratorios clínicos de la Caja Costarricense del Seguro Social (CCSS) no están sometidos a la fiscalización de un ente regulador del desempeño analítico de sus analizadores, ni tampoco son laboratorios acreditados por el Ente Costarricense de Acreditación (ECA) o similares, razón por la cual para el laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios no es requisito fundamental aplicar protocolos de verificación de equipos durante el funcionamiento de los analizadores a lo largo de los diferentes periodos contractuales, sin embargo, es una buena práctica de laboratorio su correcta y oportuna aplicación.

El laboratorio de química clínica del Hospital San Juan de Dios, posee un histórico de control de calidad minucioso y estricto, con metas de calidad (CLIA), y con estimación de la herramienta estadística sigma de desempeño analítico desde hace más de dos años. Sin embargo, desde su instalación (hace más de 5 años), nunca se ha aplicado un protocolo de verificación de la calibración y linealidad en los analizadores AU680 de dicho hospital, por lo cual surge la duda de si con el transcurso del tiempo el analizador ha perdido linealidad y la capacidad de reportar resultados dentro del intervalo de medición analítica reportado por fabricante.

Además, para compensar los sesgos observados en el control de calidad externo RIQAS, se ha recurrido a aplicar factores de ajuste de factor de correlación que podrían afectar la exactitud de los resultados de los diferentes parámetros o incluso la linealidad de la prueba. Esto aplica principalmente para la determinación de la actividad de las enzimas: ALT, AST, CK, LDH, ALP, AMY y GGT, las cuales por la naturaleza del negocio y disposiciones de fabricante, no se calibran en la plataforma analítica en uso, únicamente se someten a blanco de reactivo, ya que manejan un factor de calibración constante (MB) desde su instalación, en comparación con otros parámetros sometidos a calibración periódica, como el Colesterol, Triglicéridos, Glucosa, Ácido Úrico, Nitrógeno Ureico y Creatinina, entre otros.

La guía del CAP para química y toxicología (2017) define calibración como:

“Conjunto de operaciones que establecen, en condiciones específicas, la relación entre la respuesta del instrumento y los valores correspondientes de concentración / actividad de un analito. Los procedimientos de calibración generalmente se especifican en las instrucciones del fabricante, pero también pueden ser establecidos por el laboratorio”.

Es debido a que no se cuenta con un calibrador de enzimas que se hace necesario aplicar ajustes en el factor de correlación de pendiente y de intercepto, los cuales funcionan como un ajuste manual de la calibración de las pruebas, y es la razón por la cual los ajustes para las enzimas son mucho más grandes en magnitud que para las demás pruebas (ver Tabla 2), ya que las variaciones de cambio de piezas de los instrumentos, mantenimientos correctivos o preventivos y cambios de lote de reactivos, son compensadas por dichos ajustes para mantener un desempeño óptimo en el control de calidad externo.

Las demás pruebas de rutina básica de química clínica que incluyen: glucosa, colesterol, triglicéridos, nitrógeno ureico, creatinina, ácido úrico, entre otras, para la plataforma analítica Beckman Coulter AU680, si cuentan con un calibrador con concentraciones definidas trazables a un método de referencia, utilizable de forma periódica o cuando lo requiera, de forma que los ajustes aplicados en el factor de correlación A y B son mínimos (ver Tabla 2), y además cumplen con una cadena de trazabilidad metrológica que garantiza la estandarización de los resultados.

La trazabilidad metrológica según el Vocabulario Internacional de Metrología (2012), la definimos como:

“La propiedad de un resultado de medida, por la cual el resultado puede relacionarse con una referencia mediante una cadena ininterrumpida y documentada de calibraciones, cada una de las cuales contribuye a la incertidumbre de medida”.

Según la norma ISO 17511 y ISO 18153, la trazabilidad a materiales de referencia reconocidos y aceptados internacionalmente, considera el elemento clave para asegurar la exactitud y la comparabilidad de los resultados aportados por un laboratorio clínico (Panteghini, 2007).

En Europa, a diferencia de América, el fabricante de la plataforma analítica distribuye un calibrador “Master Calibrator” con Referencia 66300, el cual es utilizado para realizar un ajuste del factor MB para las enzimas, cuando sea necesario, según las especificaciones de la versión europea de cada inserto para cada prueba.

De esta forma para la misma plataforma analítica, con la misma presentación de reactivos, en Europa sí utilizan un calibrador de enzimas trazable a un método de referencia con un valor de actividad enzimática definido y conocido, por lo que para analizadores instalados en este continente no es necesario aplicar ajustes de factor de correlación para compensar variaciones en el desempeño de las prueba, sino que realizan una recalibración y reasignación del factor MB según el procedimiento descrito en su inserto.

Para la misma versión de reactivo, en el mismo instrumento, en América, los insertos para enzimas no hacen referencia a la utilización del Master Calibrator Ref.66300, por el contrario, para su correcta instalación se recomienda aplicar un protocolo de “verificación de enzimas” con un material como Verichem o similares y aplicar con los resultados ajustes en el factor de correlación A y B, más no en el factor MB, preestablecido por fabricante.

Verificación de la Calibración

Como se mencionó anteriormente, el objetivo del protocolo de verificación de calibración es detectar una inexactitud del método analítico, para esto evalúa el porcentaje de error entre la media de los resultados obtenidos y el valor establecido como valor de referencia del material utilizado a lo largo del intervalo analítico de la prueba declarado por fabricante.

Para la prueba de Glucosa, los resultados de % de error para los 5 niveles de concentración evaluados son inferiores que el 50% de la meta de calidad analítica (ETa), utilizando como meta de calidad la definida por CLIA, incluso los valores de porcentaje de error obtenidos son inferiores que el 25% de la meta con y sin ajuste del factor de correlación por lo que en ambos casos la clasificación del error es de categoría “A” (ver Cuadro 1 y 4).

El ajuste realizado en Glucosa equivale a un 2,3% positivo del valor de pendiente ($A=1,023$) lo que significa que con ajuste los resultados deberían ser en promedio 2,3% más altos, esto para compensar un error sistemático constante observado en el control de calidad RIQAS (ver Cuadro 2).

Si observamos el gráfico de representación de exactitud con y sin ajuste de factor de correlación (ver Figura 1. A y B), los resultados obtenidos no solamente se encuentra dentro el criterio de aceptación establecido por Verichem (50% de ETa) representado como porcentaje de recuperación, sino también se encuentran dentro de la variación del grupo de comparación o grupo par, en ambos gráficos, a pesar de que como es de esperar en el gráfico B los resultados son ligeramente más altos debido al ajuste realizado por lo que se alejan un poco de la media del grupo par y además de una recuperación del 100% del valor esperado.

Para triglicéridos, ocurre la misma situación que con glucosa, para todos los niveles evaluados la categoría del error es “A”, de forma que cumplen con el 25% de la meta de calidad CLIA (10 mg/dl o 25%) (ver Cuadro 5). Los resultados del gráfico de evaluación de exactitud (ver Figura 2. A y B) son prácticamente los mismos resultados con y sin ajustes, esto obedece a que el ajuste aplicado es apenas de un 0,05% positivo ($A=1,005$) por lo que las diferencias son mínimas en los resultados con y sin ajustes de factor de correlación.

Para el parámetro nitrógeno ureico, los resultados sin ajuste de factor de correlación muestran en los niveles B, C y E de evaluación un porcentaje de error inferior al 50% de la meta de calidad CLIA, pero no menor al 25% de esta, razón por la que cumplen con la exactitud esperada del método pero está clasificado con categoría “B”, los mismo sucede con los resultados con ajuste donde para los niveles B,C y D la categoría de clasificación es B

(ver Cuadro 6). En este caso el ajuste de factor aplicado en pendiente es de 1,5% positivo ($A=1,015$), por lo que los resultados en el gráfico B con ajuste (Ver Figura 3) son aproximadamente 1,5% más elevados respecto a los resultados sin ajuste. Sin embargo, en ambos casos se encuentran dentro de las 2 SD del grupo par.

La prueba de creatinina no posee ajuste de factor ($A=1$ y $B=0,0$) (ver Tabla 2), por lo que el análisis de los resultados lo realizamos únicamente para los resultados sin ajuste. En este caso para todos los niveles evaluados el porcentaje de error para creatinina cumple con el 25% de la meta de calidad, por lo que recibe clasificación “A” según el método de evaluación del material Verichem (ver Cuadro 7). Si observamos el gráfico A (Figura 4), los resultados obtenidos se encuentran muy cercanos al 100% de recuperación, es decir un error porcentual cercano a 0,0%, a excepción del nivel A, donde el resultado reportado se encuentra dentro las 2SD del grupo. Sin embargo, por ser una magnitud tan baja se permite mucho mayor diferencia como criterio de cumplimiento.

El colesterol y ácido úrico, cumplen con el criterio de un porcentaje de error inferior al 50% de la meta de calidad (CLIA). Sin embargo, ácido úrico en el nivel más bajo de concentración (Nivel A), no cumple con el criterio de porcentaje de error inferior al 25% del ETa sin ajuste ni con ajuste, y por esto el ácido úrico recibe una clasificación de “B” y colesterol una de “A” (ver Cuadro 8). Ambas pruebas poseen el mismo ajuste de factor; en pendiente un 3,5% positivo ($A=1,035$), por lo que los resultados obtenidos con ajuste son proporcionalmente 3,5% más altos en comparación con los resultados sin ajuste. Sin embargo, en ambos casos y para ambas pruebas se cumple con el criterio mínimo de exactitud (ver Figura 5 y 6: A y B).

Como se mencionó anteriormente, los parámetros de bioquímica básica (glucosa, colesterol, triglicéridos, creatinina, nitrógeno ureico y ácido úrico), al calibrarse entre cambios de lote de reactivos, y al poseer una calibración periódica dentro del analizador, las modificaciones del factor de correlación en la pendiente para compensar un sesgo estadístico en el RIQAS han sido mínimas (ver Cuadro 2), siendo la modificación más elevada la de colesterol y ácido úrico de un 3,5%, de forma que los resultados obtenidos con y sin ajuste

no son significativamente diferentes y por esto, para todas las pruebas se cumple con el mínimo establecido de la verificación de la calibración, o evaluación de la exactitud.

La enzima ALT, posee un ajuste en el factor de correlación de un 9,4% ($A=1,094$), al ser un ajuste proporcional significativo, los resultados a mayor actividad enzimática van a presentar mayor diferencia respecto a los de menor actividad, en comparación con la prueba sin aplicación de ajustes.

En este caso, para ALT, la meta de calidad CLIA es de $ETa = 10$ U/L o 20%, para la prueba sin ajustes todos los niveles evaluados cumplen con el criterio de porcentaje de error, respecto al valor de referencia, inferior al 25% del ETa , por lo tanto la prueba sin ajuste recibe una categorización de “A”. Sin embargo, la magnitud del ajuste en este caso implica que con una actividad superior al nivel B evaluado la categorización de los resultados para los niveles C,D,E, y F sea de “B” (ver Cuadro 10), de forma que cumplen con el 50% de ETa , pero el ajuste implica un porcentaje de error mayor y por lo tanto un reporte de resultados más sesgado respecto al valor de referencia y al grupo de comparación (Ver Figura 7: A y B).

Los resultados obtenidos para Creatina-Kinasa fueron muy similares a los de ALT, en este caso el ajuste aplicado es de 13,56% sobre la pendiente, es decir un ajuste proporcional, tanto los resultados del ajuste como sin ajuste cumplen con el 50% el ETa (ver Cuadro 12), sin embargo, con el ajuste aplicado a partir del nivel de actividad enzimática B los resultados muestran un porcentaje de error mayor al 25% por lo que son clasificados como “B”. Sin ajuste los resultados muestran un porcentaje de error para todos los niveles de actividad con clasificación de “A” (ver Cuadro 3), por lo que, podríamos asumir que en este caso al igual que para ALT los ajustes aplicados para reducir el sesgo en el programa RIQAS, implican un mayor sesgo al correr el protocolo de verificación de calibración con el material Verichem en comparación con el valor de referencia y el reportado por el grupo de comparación (ver Figura 9: A y B).

La enzima AST, muestra una clasificación de “B” para los resultados de porcentaje de error, tanto con ajustes como sin ajustes (ver Cuadro 11), por lo que en este caso algunos de los niveles de concentración en ambos casos cumplen con el 50% del ETa más no con el 25% de este. Además, es curioso observar que con el ajuste de 12% en la pendiente, únicamente los niveles de actividad E y F (los de mayor actividad), muestran una clasificación de “B”, ya que sin ajuste los niveles con esta clasificación son el nivel C, D y F.

Al aplicar un ajuste positivo en la pendiente, para AST, los valores reportados son mayores en comparación que los resultados sin ajuste, en este caso la enzima sin ajuste posee un sesgo negativo respecto al valor tomado como referencia y la media de comparación (ver Figura 8: A), al aplicar el ajuste, el sesgo observado en los dos últimos puntos de evaluación es, por el contrario, positivo (ver Figura 8: B), por lo que para esta enzima podríamos asumir que es necesario reducir el ajuste en la pendiente para la reducción del sesgo observado y lograr una clasificación de “A” en todos los niveles de actividad.

Las enzimas ALP y GGT, presentaron resultados similares, sin ajuste el resultado de clasificación se sesgo de ambas es de “A”, es decir un desempeño excelente. Sin embargo, ambas enzimas poseen un ajuste significativo, en el caso de ALP el ajuste en tanto en pendiente (29,35%) como en intercepto (-28,25 U/L) (ver Cuadro 13), para GGT es únicamente en pendiente de un 14% (ver Cuadro 15), y estos ajustes generan en ambos casos un sesgo analítico que supera el 50% del ETa, por lo que para ambas enzimas los resultados con los ajustes no cumplen con el criterio de aceptación de verificación de calibración y reciben una clasificación de “D” (ver Cuadro 17) (ver Figuras 10 y 12: A y B).

Además, ALP al poseer un ajuste constante todos los resultados reportados serán 28,25U/L más bajos respecto a los resultados sin ajuste, y es por esto que en el nivel de actividad más bajo evaluado (Nivel A), con un valor de actividad enzimática de referencia de 7U/L, los resultados reportados por el analizador correspondían a valores negativos, razón por la cual no se pudo realizar una interpretación del porcentaje de error a este nivel de actividad.

Es entonces importante recalcar que para las enzimas ALP y GGT, los ajustes realizados a las pruebas para compensar sesgos observados en RIQAS, generan un sesgo significativo en los resultados desde el punto de vista analítico y clínico por lo que para ambas enzimas es importante determinar la razón de la diferencia al utilizar como referencia del sesgo un programa de control externo interlaboratorio como RIQAS, o un material para verificación de la calibración como Verichem.

En caso contrario al anterior, las enzimas Amilasa y LDH, presentan mejores resultados al aplicar los ajustes que sin aplicarlos; para Amilasa el ajuste en pendiente de un -12% con un ajuste en intercepto de 7,26 U/L, LDH presente un ligero ajuste en pendiente de un 2,55% únicamente.

Para Amilasa los resultados sin ajuste son clasificados como “F” para verificación de la calibración, con ajuste son clasificados como “D” para los dos primeros niveles de actividad (A y B) (ver Cuadro 16). En este caso los ajustes aplicados tomando como referencia RIQAS logran compensar un sesgo con el material Verichem. Sin embargo, es necesario reducir el ajuste en el intercepto, ya que al ser un ajuste constante de 7,26 U/L, los resultados a bajos niveles de actividad como 11U/L (Nivel A) o 64U/L (Nivel B), presentan un sesgo que supera el 50% del ETa, aunque es importante destacar que para enzimas como Amilasa los niveles de actividad clínicamente relevantes son mayores a estos valores.

Para LDH, el ajuste de 2,55% en pendiente parece compensar parcialmente un sesgo observado en Verichem si comparamos los resultados con y sin ajuste (ver Figura 11). Sin embargo, el ajuste de 2,55% no es suficiente y por esto recibe una clasificación de sesgo de “C” (ver Cuadro 17).

Es importante recalcar que una recuperación baja de la actividad enzimática en comparación con el grupo par como la observada para enzimas como LDH, , independiente del ajuste aplicado, puede corresponder a un deterioro del material utilizado, por lo que se recomienda repetir el protocolo para poder asegurar la repetibilidad de los resultados.

Si observamos los resultados de clasificación del sesgo con y sin ajuste (Figura 14), podemos ver que dentro de los 13 parámetros dentro del alcance, las enzimas ALP, LDH, GGT y AMY con ajustes no cumplen con el criterio de aceptación del 50% del ETa según las especificaciones de CLIA, sin ajuste ALP y GGT si logran cumplir la especificación, por lo que a pesar que todos los parámetros cumplen con los criterios de linealidad según el material utilizado (Verichem), estas 4 enzimas poseen un sesgo significativo tanto estadístico como clínico, por lo que es necesario su intervención inmediata para reducción del sesgo.

Además, otros parámetros como ALT y CK presentan un mayor sesgo aplicando el ajuste de factor de correlación en comparación con los resultados sin aplicarlo, caso contrario para las enzimas LDH y AMY que presentan mayor sesgo sin ajuste que aplicando el ajuste.

Es importante recalcar que los ajustes en el factor de correlación A y B se realizan con el objetivo de corregir un sesgo observado en RIQAS (herramienta para evaluar error sistemático utilizada en el laboratorio clínico del Hospital San Juan de Dios). Sin embargo, este programa (RIQAS) es de origen Europeo, donde la mayoría de los laboratorios participantes los cuales contribuyen a establecer el valor utilizado como referencia para cada alícuota, son europeos por igual, y utilizan un calibrador (System Calibrator) de primera opinión trazable a métodos de referencia para enzimas para establecer el factor MB.

En el laboratorio y en general en Costa Rica para todos los laboratorios que utilizan la plataforma Beckman Coulter y control externo RIQAS, al no poseer el “System Calibrator” para enzimas, y utilizar como referencia de error sistemático un valor reportado por laboratorios con una metodología que se mantiene trazable metrológicamente a un estándar de referencia, los sesgos obtenidos en el programa son significativos, y la única herramienta con la que se cuenta para compensar y contrarrestar estos sesgos es aplicar ajustes en factores de correlación.

Por otro lado, al utilizar para verificación de calibración y linealidad un material comercial de marca Verichem el cual es fabricado en Estados Unidos, y a pesar de que el material utilizado es adquirido específicamente para la plataforma analítica en uso, los

valores de referencia y los valores reportados por el grupo de comparación tampoco son trazables metrológicamente a un estándar de referencia ya que en Estados Unidos al igual que en Costa Rica no se utiliza el calibrador System Calibrator.

Esto explica la razón del por qué para la mayoría de enzimas dentro del estudio, los resultados de sesgo para evaluar exactitud con el protocolo de verificación de calibración, con el material Verichem, son insatisfactorios o presentan un peor desempeño al aplicar ajuste en factor de correlación en comparación con los resultados sin ajustes.

El control Unity, es un programa de control interno interlaboratorio, que permite a partir de los resultados del control interno, para cada plataforma analítica, establecer una media de comparación entre los laboratorios participantes, este programa es de origen estadounidense, por lo que, según lo explicado anteriormente el comportamiento de los resultados de control interno del AU680 del Laboratorio del Hospital San Juan de Dios, debería ser similar a los resultados obtenidos en este estudio.

Sin embargo, adicional a lo que ofrece el programa RIQAS, Unity presenta una media de comparación para los participantes que utilizan el calibrador “System Calibrator” para enzimas y una media de comparación distinta para quienes no lo utilizan, por lo que a pesar de que en Costa Rica no se utiliza este calibrador, debido a los ajustes de factor aplicados, se debe de utilizar como comparación la media de los laboratorios que si lo utilizan.

Como es de esperarse con el programa Unity, como se muestra en la Figura 15, y según los resultados de comparación del Cuadro 19, los sesgos reportados entre medias del control interno para ambos niveles de control, para enzimas, son mucho menores si se utiliza como referencia la media de los laboratorios con calibrador en comparación a si se utilizara la media que corresponde (sin calibrador), con la única excepción para el Nivel 3 de CK.

Verificación de la Linealidad

El material Verichem, establece como criterio de aceptación de linealidad, un error máximo de no linealidad (a lo largo de todo el intervalo analítico reportado por fabricante), que sea inferior al 25% del error total aceptable de la meta de calidad analítica utilizada, en este caso la definida por CLIA.

En el informe de resultados provisto por el Software de reducción de datos de Verichem se muestra la ecuación de la recta de mejor ajuste del triplicado de los resultados. Sin embargo, como se mencionó anteriormente esta ecuación de recta no se utiliza para evaluar la linealidad del método, ya que, como sabemos el objetivo de este protocolo no es evaluar la magnitud de la diferencia entre el resultado medido y el de referencia, sino más bien la diferencia (en porcentaje) entre el resultado medido y el resultado explicado por una línea recta de mejor ajuste (linear fit), debe ser inferior al criterio de aceptación (25% del ETa).

Además, con el cumplimiento de la linealidad de los resultados entre diferentes valores de concentración del material evaluado se puede determinar la verificación del intervalo de medición analítica reportado por el fabricante.

Todos los parámetros evaluados con y sin ajuste del factor de correlación cumplen con el criterio de aceptación de linealidad dentro de todo el intervalo analítico evaluado (ver Cuadros 4-16).

Debido al ajuste en el intercepto $B = -28,25$ U/L y pendiente $A = 1,2935$ (29,35%), para la enzima ALP con ajuste del factor de correlación, la verificación del intervalo de medición analítica para el punto de evaluación con la menor actividad enzimática (Nivel A), mostró resultados negativos por lo que no fue considerado este punto en la verificación de la

linealidad, por esto el intervalo analítico verificado es de 33 – 2004 U/L. Sin embargo el reportado por el fabricante es de 5 - 1500 U/L.

Según la guía EP6-A, para una correcta interpretación del resultado del protocolo de verificación de la linealidad y del intervalo de medición analítica, se deben de evaluar como mínimo 5 diferentes puntos a lo largo del intervalo analítico reportado por fabricante (CLSI EP06-A, 2003). En este caso se eliminó el Nivel A pero aún la interpretación de los resultados es correcta debido a que restan 5 puntos de evaluación adicionales.

Sin ajustes el intervalo analítico verificado para ALP es de 7-1565 U/L, por lo que, a pesar de que los ajustes en el factor de correlación no afectan la interpretación del cumplimiento de la linealidad, el intervalo de medición analítica si se puede ver afectado, como en este caso, no solamente en niveles de actividad enzimática bajas que dieron resultado negativo, sino también al poseer un ajuste proporcional en A de un 29%, los resultados a niveles de actividad altos son mucho más elevados en comparación a los resultados sin ajuste y por esto el punto máximo del intervalo reportable supera por más de 400 U/L el máximo establecido por el fabricante.

Para los demás parámetros se logró verificar más del 90% del intervalo de medición analítica reportado por el fabricante (ver Cuadro 18), con la única excepción de la enzima AST donde el nivel más alto de actividad evaluado es de 750 U/L, siendo el reportado por fabricante en su inserto un valor máximo de actividad enzimática de 1000 U/L.

Es importante rescatar que posterior a una verificación del intervalo de medición analítica mediante un protocolo de verificación de linealidad, los resultados reportados por debajo del mínimo verificado se deben de reportar como inferiores a este valor, y los resultados que se encuentren por encima del intervalo de medición analítica verificado, se les debe de aplicar un factor de dilución para su determinación correcta por el sistema analítico.

Los resultados de coeficiente de variación para el triplicado de los resultados, cumplen con el 25% del valor de meta de calidad analítica establecido como presupuesto de variación máximo aceptable, por lo que la interpretación de los resultados de linealidad es válida en el presente estudio.

Con el ensayo realizado podemos sintetizar que, a pesar de que con el mismo material comercial se puede aplicar un protocolo de verificación de calibración y linealidad, la forma de evaluar los resultados es distinta, de forma que un método de ensayo puede cumplir con el protocolo de calibración pero no con el de linealidad analítica o viceversa.

Además, se demostró la influencia que tiene el material de control externo de calidad sobre la exactitud de las pruebas para las plataformas analíticas que permiten ajustes de factores de calibración, también la importancia de contar con una trazabilidad analítica para los métodos de ensayo con el fin de reducir el sesgo estadístico y clínico al momento de reportar los resultados, y además la importancia de la estandarización por parte del fabricante de la trazabilidad de su calibración independientemente de la región geográfica en la se encuentre.

Por estas razones es de gran importancia la aplicación periódica de protocolos de verificación de desempeño analítico como la verificación de la linealidad y de calibración, y se recomienda independientemente de la trazabilidad metrología utilizada, aplicar un protocolo de verificación del intervalo de referencia biológico, ya que los resultados reportados en cada país y región se ven influenciados por múltiples factores que podrían comprometer el sesgo analítico y clínico y por lo tanto el reporte final de los resultados.

Conclusiones

1. Para estudios de verificación de linealidad según la guía CLSI EP6-A se puede utilizar material comercial, debido a la dificultad de la disposición de muestras de pacientes con valores altos y bajos que abarquen la mayor parte del intervalo lineal del fabricante.
2. El protocolo de verificación de calibración tiene como objetivo la evaluación de la exactitud del método evaluado, para lo cual requiere del uso de material con valores de referencia conocidos, idealmente con trazabilidad metrológica a método de referencia.
3. El protocolo de verificación de la linealidad basado en la guía EP06-A permite evaluar si los resultados se comportan de forma lineal a lo largo del intervalo de medición analítica reportado por fabricante, además permite la estimación de este intervalo.
4. Para aplicar el protocolo de verificación de la linealidad no es necesario emplear material con valores conocidos con trazabilidad metrológica a un método de referencia.
5. Se logró verificar el intervalo de linealidad para los análisis Glucosa, Nitrógeno Ureico, Creatinina, Triglicéridos, Colesterol, Ácido Úrico, ALT, AST, AMY, GGT, LDH, CK y ALP, sin y con ajustes de factor de correlación en el analizador AU680 evaluado.
6. La verificación del intervalo de medición analítica para ALP muestra un intervalo más estrecho que el establecido por el fabricante al analizar los resultados con ajuste de factor de correlación.
7. Las enzimas poseen mayor ajuste de factor de correlación en comparación con el resto de parámetros dentro del estudio. Estos ajustes provocan el no cumplimiento de las especificaciones para el protocolo de verificación de calibración para enzimas GGT y ALP.
8. Las enzimas ALT y CK presentan peores resultados en este mismo protocolo con los ajustes realizados en comparación sin los ajustes.

9. Las enzimas LDH y AMY, no cumplen con las especificaciones del protocolo de verificación de calibración con y sin ajustes del factor de correlación, por lo que es necesario verificar el desempeño analítico de las pruebas con un material con trazabilidad metrológica a estándar de referencia.
10. Glucosa, Triglicéridos, Nitrógeno Ureico, Creatinina, Colesterol, Ácido Úrico, ALT, AST y CK cumplen con las especificaciones del protocolo de verificación de calibración y por lo tanto no presentan errores de inexactitud con y sin ajustes del factor de correlación.
11. Para enzimas existe una gran influencia del control de calidad externo seleccionado para evaluar el error sistemático sobre los ajustes de factores de correlación en la plataforma analítica AU680, por lo que se recomienda seleccionar el material que más se adapte a las características del método de ensayo utilizado en el laboratorio.
12. El programa de control de calidad RIQAS no realiza una clasificación de los grupos de comparación para la determinación de enzimas en la plataforma analítica AU680, entre los que tienen trazabilidad metrológica con el System Calibrator (Europa) y los que no lo tienen (América).
13. Para enzimas, en el Hospital San Juan de Dios, y en los laboratorios que utilicen la plataforma analítica AU680 de Beckman Coulter y adicional utilicen el control de calidad externo RIQAS, es necesario la implementación del System Calibrator tal como lo recomiendan la versión europea de los insertos.
14. No existe una estandarización por parte de Beckman Coulter a nivel mundial referente a la trazabilidad metrológica de las enzimas en su plataforma analítica AU series.
15. El control de calidad externo interlaboratorio Unity, es una buena herramienta para evaluar error sistemático para enzimas en la plataforma AU series de Beckman Coulter.
16. El material Verichem para enzimas no provee valores de referencia con trazabilidad metrológica a un estándar de referencia.
17. Verichem no es un material adecuado para aplicar el protocolo de verificación de la calibración al utilizar la plataforma analítica AU680, sin calibrador de enzimas, con

ajustes del factor de correlación para compensar sesgos observados en el programa de control de calidad externo RIQAS.

18. Es necesario aplicar protocolos de verificación del intervalo de referencia biológico, principalmente para enzimas, independientemente de su trazabilidad metrológica.

Referencias

1. Killen, A. A., Long, T., Souers, R., Styer, P., Ventura, C. B., & Klee, G. G. (2014). Verifying performance characteristics of quantitative analytical systems: calibration verification, linearity, and analytical measurement range. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 138(9), 1173-1181.
2. CLSI. (2003). Evaluation of linearity of Quantitative Measurement Procedures: A Statistical Approach; Approved Guidelines. EP06-A, Vol. 23 No.16.
3. Araujo, P. (2009). Key aspects of analytical method validation and linearity evaluation. *Journal of chromatography B*, 877(23), 2224-2234.
4. Instituto Nacional de Metrologia, Qualidade e Tecnologia. (2012). VIM–Vocabulário Internacional de Metrologia–Conceitos fundamentais e gerais e termos associados (VIM 2012).
5. Kroll, M. H., Præstgaard, J., Michaliszyn, E., & Styer, P. E. (2000). Evaluation of the extent of nonlinearity in reportable range studies. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 124(9), 1331-1338.
6. Jhang, J. S., Chang, C. C., Fink, D. J., & Kroll, M. H. (2004). Evaluation of linearity in the clinical laboratory. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 128(1), 44-48.
7. Nichols, J.H en Makowski, G.S. (2009). *Advances in clinical chemistry*, vol. 47. Academic Press, 121-136.
8. College of American Pathologists. (2017). CAP Accreditation Program: chemistry and toxicology checklist. Northfield, IL: CAP.
9. Panteghini, M. (2007). Traceability, reference systems and result comparability. *The Clinical Biochemist Reviews*, 28(3), 97.
10. CLIA. (1992). CLIA Requirements for Analytical Quality. Federal Register. 57 (40):7002-186. Recuperado de <https://www.westgard.com/clia.htm> el 23 de setiembre, 2020.
11. Randox. (2020) Riqas: Randox International Quality Assessment Scheme. Recuperado de: https://www.randox.com/wp-content/uploads/delightful_downloads/2020/11/LT033-RIQAS-Explained-OCT20-compressed.pdf el 10 de noviembre, 2020.