

Validación de métodos en el laboratorio bioquímico

Parte I

González L.G.; Capriotti, G.A. - Centro de Investigación y Biotecnología Wiener Laboratorios S.A.I.C. - Rosario - Argentina.

La norma ISO 15.189 en su punto 5.5 "Procedimientos analíticos", especifica que los métodos empleados por el laboratorio deben estar perfectamente validados y que toda la información referida a su performance (exactitud, imprecisión, linealidad, etc) debe estar debidamente registrada. La CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) define Validación como "todas las acciones destinadas a probar que un determinado proceso, sistema, equipamiento, o método trabaja de la manera esperada y logra los resultados propuestos".

La validación de un método analítico debe realizarse a través de un proceso estandarizado que involucra una serie de pasos:

- Definición "a priori" de las Especificaciones o Requerimientos de Calidad. Estas luego deberán ser aplicadas para poder juzgar si la performance del método puede considerarse aceptable o no.
- Diseño de un experimento cuidadosamente planeado de manera tal que, a partir de él se puedan obtener una determinada cantidad de datos.
- Análisis de esos datos empleando un método estadístico apropiado, de manera de poder extraer conclusiones acertadas. No se debe perder de vista que, en definitiva, el objetivo único y final de la validación de un método es estimar cuanto

error hay en el resultado obtenido con un sistema dado en un laboratorio.

Una vez conocido, es deseable establecer como afectará esta cantidad de error a la interpretación de un resultado y si esto va a comprometer o no la decisión futura que el médico pueda tomar con un paciente al basarse en él.

Especificación de los requerimientos de calidad

Una vez que hemos llevado a cabo todos los experimentos, que hemos reunido los datos y hemos estimado los diferentes tipos de error, surge la pregunta de si ese error puede ser considerado como aceptable o no. Para ello es imprescindible que previamente hayamos establecido nuestras metas de aceptabilidad en lo que a error se refiere. Desde Tonks han sido muchas las aproximaciones realizadas para definir estas metas o "goals" analíticos.

La postura de los EE.UU, a través de lo establecido por el CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments), introduce el concepto de "Error Total", considerado como la diferencia máxima que puede tolerarse para una única medición en un "Proficiency Test Survey". No debemos olvidar que el concepto de error total involucra una com-

Cada vez que en el laboratorio se desea implementar un nuevo método analítico, previamente debe evaluarse la performance del mismo. Esto se torna imprescindible si se considera que dicho método generará un resultado, el cual debe ser confiable y fundamentalmente, debe ajustarse perfectamente a los fines clínicos para los cuales está destinado.

ponente de error aleatorio (imprecisión) y una de error sistemático (inexactitud). Los requerimientos (goals) del CLIA se basan fundamentalmente en el "estado del arte" y derivan de programas de evaluación interlaboratorial y de la performance obtenida por laboratorios calificados que emplean la metodología disponible en la actualidad. Una desventaja de esto, es que si consideramos que la performance de un método se ve muy influenciada por los permanentes avances tecnológicos, el "estado del arte" irá sufriendo modificaciones con el tiempo, con lo cual será inevitable que los criterios de aceptabilidad también deban ser redefinidos continuamente.

Los países europeos, por el contrario, han empleado un criterio diferente en la definición de estos goals o requerimientos de calidad analíticos: un criterio clínico, definido por la mínima calidad analítica requerida y que aún puede considerarse aceptable, para una situación clínica en la cual una decisión médica debe ser tomada y un criterio biológico basado en la variación biológica de la determinación.

Contrariamente al CLIA, éstos consideran separadamente un criterio para la imprecisión y otro para la inexactitud, y a partir de ellos se calcula el Error Total.

El criterio basado en variabilidad biológica ha sido ampliamente aceptado como el más satisfactorio. Su principal ventaja es que es un modelo simple de entender y que existen en la bibliografía gran cantidad de datos sobre variabilidad biológica. Su principal desventaja es que los criterios de aceptabilidad derivan de la aplicación de ciertas expresiones matemáticas cuyas fracciones son algo empíricas. En la Tabla I se muestran las distintas expresiones de cálculo del Coeficiente de Variación (CV) como medida de estimación de la imprecisión del método y del Bias porcentual (B%) como medida de estimación de la inexactitud basados en el concepto de variabilidad biológica, según se categorice a la performance como óptima, deseable o mínima.

Para algunas determinaciones los requerimientos de calidad que surgen de aplicar este criterio, resultan más estrictos de lo que puede lograrse con la metodología actualmente disponible. Por lo tanto, por el momento deben ser sólo considerados como "targets" (o sea, aquellos hacia donde deseamos ir) y no estrictamente como "criterios de aceptabilidad" inflexibles.

Tabla I

IMPRECISION	PERFORMANCE
$CV < 0.25 \times CV_1$	Óptima
$CV < 0.50 \times CV_1$	Deseable
$CV < 0.75 \times CV_1$	Mínima
CV: Imprecisión del método estimada como CV total CV ₁ : Variabilidad Biológica intraindividual.	
INEXACTITUD	PERFORMANCE
$B\% < 0.125 \times [CV_1^2 + CV_G^2]^{0.5}$	Óptima
$B\% < 0.250 \times [CV_1^2 + CV_G^2]^{0.5}$	Deseable
$B\% < 0.375 \times [CV_1^2 + CV_G^2]^{0.5}$	Mínima
B%: Inexactitud del método estimada como Bias % CV ₁ : Variabilidad Biológica intraindividual CV _G : Variabilidad Biológica grupal	

Otro criterio de bastante difusión para establecer requerimientos de calidad es el basado en la "Opinión de expertos", los cuales proveen conceptos interesantes que en general son de naturaleza totalmente empírica. Un ejemplo de esto son los goals establecidos por el NCEP (National Cholesterol Education

Program) para las determinaciones de Colesterol, Triglicéridos, y HDL colesterol.

La Tabla II muestra los distintos requerimientos de calidad publicados para algunas de las determinaciones de uso frecuente en el laboratorio clínico (valores actualizados al año 2006).

Tabla II

Determinación	CLIA		Variabilidad Biológica	
	Error Total %	Imprecisión %	Inexactitud %	Error Total %
Glucosa	± 10% ó 6 mg/dL	2.9	2.2	6.9
Colesterol	± 10 %	3.0	4.0	9.0
Creatinina	± 15% ó 0.3 mg/dL	2.2	3.4	6.9
GOT	± 20%	6.0	5.4	15.2

Diseño de un plan para validar un método

El diseño empleado debe cumplir con dos condiciones:

- debe emplear ensayos o experimentos específicos para estimar la magnitud de los diferentes tipos de errores analíticos;
- debe ser práctico en lo que respecta al tiempo, al esfuerzo requerido y a los costos.

Los aspectos fundamentales de una validación incluyen como puntos primordiales la evaluación de la precisión, exactitud y rango reportable. En algunas situaciones es importante agregar otros ensayos como por ejemplo: límite de detección, intervalo de referencia, interferencias, recuperación, etc. Algunos de estos experimentos serán descritos, con mayor detalle en el próximo número de este boletín.

Una vez completados los experimentos y obtenidos los correspondientes parámetros estimadores de los diferentes tipos de error, debe realizarse el juicio acerca de la aceptabilidad de la performance del método estudiado.

Criterios para evaluar aceptabilidad de performance

Que la performance de un dado método

sea juzgada como aceptable o no, dependerá de cuanto error analítico sea permitido, de manera que no afecte o limite el uso y la interpretación de un resultado.

El error total de una medición está compuesto por un error aleatorio y uno sistemático y viene calculado por la siguiente expresión:

$$ET = ES + ER \quad ET = \text{bias} + 3s$$

En donde "s" es el desvío estándar del método, estimado a partir del experimento de replicación y "bias" es la diferencia promedio si se empleó un Test T, o la diferencia $Y_c - X_c$ si se empleó un análisis de regresión. Como mencionamos anteriormente, esto se detallará en el próximo número. A menudo se emplean expresiones porcentuales para estos errores, en cuyo caso los términos deberán ser reemplazados por Bias % y CV respectivamente.

La performance del método podrá ser considerada aceptable si el error total calculado es menor al "error total máximo permitido".

Los criterios de aceptabilidad de la performance que propone el CLIA para sus "tests de proficiencia" son una buena opción a la hora de establecer requerimientos o especificaciones de calidad analítica.

Conclusión

Lo expresado en este trabajo, tiene como objetivo fundamental proporcionar algunas pautas generales para que cada laboratorio sea capaz de implementar su propio procedimiento de validación. No debe perderse de vista que existen una gran variedad de factores propios de cada lugar, de su operatoria de trabajo, del instrumental empleado, etc, que pueden afectar la performance esperada de un dado método.

Cada laboratorio debe poder demostrar que la metodología empleada tiene un buen desempeño bajo sus propias condiciones de trabajo y que está sustentada en procedimientos debidamente estandarizados.

Solamente de esta manera podrá cumplir con su principal responsabilidad: garantizar a sus pacientes la confiabilidad de sus resultados.

Próximo n°: Parte II

- Experimento de replicación
- Experimento de determinación de linealidad
- Experimento de comparación de métodos

Referencias

- Norma Argentina IRAM:ISO 15189 - Primera Edición.
- David B. Tonks. A Study of the Accuracy and Precision of Clinical Chemistry Determinations in 170 Canadian Laboratories. Clin. Chem., Apr 1963; 9:217-233.
- Petersen H.; et al. Graphical interpretation of analytical data from comparison of a field method with a Reference Method by use of difference plots. Clin. Chem., Nov 1997; 43:2039-2046.
- Fraser C.; Petersen P.; Libeer J.; Ricós C. Proposals for setting generally applicable quality goals solely based on biology. Ann Clin Biochem 1997; 34:8-12.
- CLIA - Clinical Laboratory Improvement Amendments. CLIA Final Rules.
- Ricós C. - Biological Variation Database and Quality Specifications. Update 2006.
- Current status of blood cholesterol measurement in clinical laboratories in the United States: a report from the Laboratory Standardization Panel of the NCEP. Clin Chem 1988; 34:193-201.
- James O. Westgard - Basic Method Validation - 2nd Edition.
- NCCLS EP5-A - Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices. February 1999.
- CLSI EP6-A - Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures. April 2003.
- NCCLS EP9-A - Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples. December 1995.



Valores de Colesterol en una población estudiantil de Córdoba

Dres. Jorge Robledo; Leonardo Siccardi; Alberto Lubetkin; Lic. María Inés Rodríguez

jorge.a.robledo@gmail.com

En el año 1997 se efectuó en la población estudiantil de Jovita, en la franja de edades comprendida entre los 5 y los 17 años, el dosaje de colesterol en sangre. En el año 2003, se repitió la experiencia, agregando en esta oportunidad las medidas de talla y peso. Estas actividades formaban parte del Programa Interinstitucional de Prevención y Educación en Salud (PIPES) en el que participaron entidades educativas, instituciones privadas, profesionales de la salud, docentes de todos los niveles, alumnos de nivel medio y habitantes de la localidad de Jovita, Pcia de Córdoba - Argentina.

Los valores de referencia para la determinación de colesterol son los que sugiere el organismo rector de estas normativas, el National Cholesterol Education Program, y ellos son:

Deseable: < 170 mg/dl
Moderadamente elevado: 170-199 mg/dl
Elevado: > 199 mg/dl

Los valores obtenidos se reflejan en la siguiente tabla:

Tabla 1

Colesterolemia	1997 (n = 756)		2003 (n = 1050)	
	N° alumnos	%	N° alumnos	%
Deseable	637	84.3	639	60.9
Mod. elevado	100	13.2	282	26.9
Elevado	19	2.5	129	12.3

Por convención se ha dado en llamar "hipercolesterolémicos" a todos aquellos que presentaron valores de 170 mg/dl o superiores. De tal modo se puede observar el crecimiento muy marcado desde el año 1997 (13.2 + 2.5 = 25.7%) al 2003 (26.9 + 12.3 = 39.2%).

Este panorama hizo pensar en la necesidad de una intervención, y se consideró que el ámbito más adecuado para lograr resultados lo constituía el área de la edu-

cación.

En el año 2003 se trabajó con la incorporación curricular, en el nivel medio, del tratamiento de temas referidos a factores de riesgo cardiovascular, y sobre las ventajas de una nutrición adecuada complementada con una buena actividad física. Las consignas principales de trabajo fueron "disminución del consumo de grasas y aumento de la actividad física".

En el año 2004 se continuó con el tratamiento en los colegios y, a través de un

convenio de extensión con la Universidad Nacional de Río Cuarto, se realizaron actividades (talleres, página web, folletería, etc.)

dirigidas a comunicar y concientizar a la población en general acerca de la necesidad de una alimentación sana.

En el año 2005 se realizó una reevaluación de los niños y adolescentes caratulados como hipercolesterolémicos en 2003, a los efectos de poder medir los posibles cambios que se pudieran haber producido.

De una población total de 417 niños y adolescentes, 244 respondieron afirma-

tivamente a la invitación y se les efectuó una extracción de sangre con la que se realizó la determinación de colesterol y otros parámetros bioquímicos.

Las siguientes tablas reflejan los resultados obtenidos específicamente en la determinación de colesterol, parámetro principal de nuestro trabajo y, a los fines de divulgación general, el más popular.

En la Tabla 2 se puede ver que en la sección «< 170 mg/dl» del año 2003 la cantidad es «0» ya que la franja de alumnos evaluados es la de los que presentaban valores > 170 mg/dl. Además, de los 244 alumnos, 89 de ellos están en estos momentos en la franja considerada como valor deseable (< 170 mg/dl). La franja de «170-199 mg/dl» se redujo de 167 alumnos a 101 y la de «> 199 mg/dl» disminuyó de 77 alumnos a 54.

En la Tabla 3 se calculó el promedio de colesterol de los 244 alumnos en el 2003 y en el 2005. Se observa un descenso del

mismo de 194 a 181 mg/dl, lo que en valores porcentuales significa una disminución promedio del 7.35%.

De los 65 alumnos 21 de ellos se hallan actualmente en la franja de "moderadamente elevados" y 13 de ellos en la franja considerada como deseable.

Conjuntamente se efectuó una breve encuesta tendiente a evaluar los cambios de hábitos en alimentación y actividad física ocurridos en los últimos dos años. El análisis de la misma permite suponer que existe una correlación entre la disminución de los niveles de colesterol, la disminución en la ingesta de grasas y el aumento de la actividad física.

Se ha logrado en un muy breve tiempo una variación sustancial de los niveles de colesterol en el grupo evaluado. No es difícil imaginar el papel fundamental desarrollado por la educación y por ende la relevante cuota de mérito que tiene en los resultados obtenidos.

Tabla 2

Colesterolemia	Año 2003		Año 2005		Diferencia	
	Nº alumnos	%	Nº alumnos	%	Nº alumnos	%
< 170 mg/dl	0	0.0	89	36.5	-89	36.5
170-199 mg/dl	167	68.4	101	41.4	66	-27.0
> 199 mg/dl	77	31.6	54	22.1	23	-9.4
Totales (n)	244		244			

Tabla 3

Valor promedio de colesterol	
2003	2005
194 mg/dl	181 mg/dl
Diferencia	
-7.35%	

Tabla 4

Sub-muestra de 65 alumnos que, en el año 2003 estaban comprendidos en la zona de colesterol elevado (mayor a 199 mg/dl)

Colesterolemia	Nº alumnos	
	2003	2005
Menores de 170 mg/dl		13
De 170 a 199 mg/dl		21
Mayores de 199 mg/dl	65	31
Totales (n)	65	65



Agenda de Congresos

Argentina

- ✓ I Congreso Panamericano de Zoonosis
 - V Congreso Argentino de Zoonosis
 - II Congreso Bonaerense de Zoonosis
- La Plata, 10, 11 y 12 de Mayo, 2006
- Organiza
Asociación Argentina de Zoonosis
- Informes
Calle 53 n° 1010
(1900) La Plata, Argentina
info@zoonosis2006.com
www.zoonosis2006.com

Paraguay

- ✓ XVII Congreso Latinoamericano de Bioquímica Clínica
 - IV Congreso Nacional de Bioquímica Clínica
- Hotel Yacht y Golf Club
Avda. del Yacht n° 11 (Lambaré)
Asunción
- 4 al 7 de Abril de 2006
- Organizan
COLABIOCLI
Asociación de Bioquímicos del Paraguay
- Informes
TE: 595-21-223288
fedqui@conexion.com.py
abpcongre2006@yahoo.com

Estados Unidos

- ✓ AACC 2006 Annual Meeting and Clinical Lab Exposition
- McCormick Place Convention Center, Chicago
- 23 al 27 de Julio de 2006
- Organiza
AACC
- 1850 K Street, NW - Suite 625 - Washington, DC USA 20006-2213
www.aacc.org/2006am/