

Validación de métodos en el laboratorio bioquímico

Parte II

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

Como dijimos en nuestro boletín N° 131, para llevar a cabo la validación de métodos, es necesario disponer de experimentos específicos. A continuación se presenta una breve descripción de los más relevantes.

Experimento de replicación

Provee información sobre el error aleatorio del método, que es un estimador de la precisión del mismo. Constituye el primer paso a realizarse en un estudio de validación.

Este ensayo consiste en realizar 20 repeticiones a una misma muestra dentro de una única largada o corrida, para luego calcular la media, el desvío estándar y el coeficiente de variación. En un ensayo de estas características, es normal observar una baja variación de los resultados alrededor de su media, o sea un error aleatorio pequeño, debido a que existen pocos factores de variabilidad que puedan afectar al resultado. Sin embargo existen otras variables que pueden no llegar a manifestarse, a menos que se definan las condiciones correctas. Para sistemas automatizados, por ejemplo, la inestabilidad propia del instrumental a lo largo de los días puede ser un factor preponderante en determinar la magnitud del error aleatorio. Lo

mismo puede decirse en referencia a otros factores como las condiciones de temperatura a lo largo del tiempo. Teniendo en cuenta esta última observación, si el ensayo de replicación "intra-corrida" no es aceptable, el método debe rechazarse, mientras que si lo es, el experimento debe continuarse durante un cierto periodo de tiempo, que debería ser no inferior a 20 días. En dicho lapso, los resultados obtenidos, proveerán una estimación más real de la variabilidad que puede afectar a ese resultado. El CLSI (ex NCCLS) en su documento P5-A (Evaluation of Precision Performance of Clinical Chemistry Devices) se refiere a este último concepto como precisión total.

Otro aspecto a tener en cuenta en un ensayo de replicación, es el número de muestras a procesar y sus concentraciones. El número de muestras dependerá de cuales sean las concentraciones críticas desde el punto de vista médico para cada determinación en particular. Generalmente se deben elegir 2 o 3 niveles correspondientes a los diferentes niveles críticos de decisión médica. Un ejemplo de esto es el colesterol para el cual los niveles críticos de decisión son 200 y 240 mg/dL según lo establecido por el NCEP.

En cuanto al número de veces que debe

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.

Experimento de determinación del rango reportable (linealidad)

Al hacer una validación es fundamental establecer el rango analítico del método, es decir, conocer el máximo o mínimo resultado que puede ser considerado confiable. El ensayo para determinación de linealidad, consiste en procesar un determinado número de muestras de concentración conocida o de una serie de diluciones realizadas a partir de una muestra única de concentración muy elevada. Los resultados obtenidos para cada una de ellas, son comparados con los valores asignados, o bien con los factores de dilución realizados. El rango reportable se establece trazando la línea recta que mejor se adapte a la mayoría de los puntos, como se muestra en la Figura 1. El CLSI en su documento EP6-A (Evaluation of the Linearity of Quantitative Measurement Procedures), recomienda un mínimo de 4 (preferentemente 5) muestras con diferentes niveles de concentración. Las muestras pueden prepararse empleando soluciones están-

dares de alta concentración o bien ser adquiridas a partir de marcas comerciales. Otra posibilidad conveniente y a su vez de bajo costo, es la de emplear muestras de pacientes o pools con alta concentración, siempre y cuando se dispongan de muestras con los niveles adecuados.

Un factor de suma importancia a tener en cuenta, es el diluyente a emplear al realizar las distintas diluciones. No debe perderse de vista que, para obtener resultados confiables, las muestras deben tener una matriz similar a las muestras reales de pacientes. En general, para determinaciones de química clínica puede emplearse agua o solución fisiológica; pero para algunos casos es recomendable el uso de soluciones de albúmina humana o idealmente una muestra sérica libre del analito a determinar, como por ejemplo en el caso de drogas de abuso. El procedimiento para preparar los diferentes niveles, consiste en el empleo de dos muestras: una con una concentración cercana a 0 o al límite de detección del método y la otra ligeramente por encima del límite superior del rango reportable que se desea validar. A partir de ellas y empleando el material volumétrico adecuado, se obtiene el resto de los niveles con concentraciones intermedias, mezclándolas en las proporciones que se indican en la Tabla I. Se recomienda realizar 4 mediciones a cada uno de los niveles.

Tabla I

| Muestra | Conc. baja | Conc. alta |
|---------|------------|------------|
| M1 | 100% | 0% |
| M2 | 75% | 25% |
| M3 | 50% | 50% |
| M4 | 25% | 75% |
| M5 | 0% | 100% |

Una vez que se ha construido el gráfico colocando los resultados obtenidos en el eje de las ordenadas y los resultados esperados (considerando los correspondientes factores de dilución) en el eje de las abscisas, debe hacerse una primera inspección visual para confirmar la existencia o no de linealidad. El análisis puede continuarse evaluando los parámetros de la recta de regresión que mejor se ajusta a esos puntos, teniendo en cuenta que la pendiente y la ordenada al origen deben tener un valor lo más próximo posible a 1 y a 0 respectivamente. También es importante tener en cuenta que la variabilidad de los 4 replicados debe ser homogénea para los diferentes niveles de concentración ensayados.

Experimento de comparación de métodos

El objetivo fundamental de este experimento es estimar la inexactitud o error sistemático de un dado método. Se lleva a cabo analizando en paralelo muestras de pacientes por el método en estu-

dio y por un método de comparación. Este último debe ser cuidadosamente seleccionado ya que, la interpretación final de los resultados se basa en haber asumido que dicho método es correcto, de manera tal que cualquier diferencia encontrada respecto del método a validar, deberá ser asignada a este último. Por esto es preferible que, de ser posible, se elija como método de comparación uno de Referencia.

En un estudio de comparación interesan fundamentalmente las diferencias sistemáticas que se encuentren en los niveles críticos de decisión médica. Sin embargo, conocer la naturaleza proporcional o constante de esos errores sistemáticos es también de utilidad si se aplican los cálculos estadísticos apropiados. Un número de 40 muestras distintas debe ser ensayado por ambos métodos. Las mismas deben ser seleccionadas de modo tal que estén uniformemente distribuidas a lo largo del rango reportable de la determinación. En este aspecto, el número de muestras es menos importante que la calidad de las mismas: 20 muestras cuidadosamente seleccionadas en base a su concentración, seguramente brindará mayor información que un centenar de las mismas aleatoriamente recibidas en el laboratorio. La principal ventaja de procesar un número muy grande de muestras, es que permitirá identificar casos individuales en los que no exista acuerdo entre los dos métodos debido por ejemplo, a la presencia de interferencias.

Si bien cada muestra puede ser procesada una única vez, es ventajoso realizar cada determinación por duplicado, tal como lo postula el CLSI (ex NCCLS) en su documento EP9-A (Method Comparison and Bias Estimation Using Patient Samples). Los duplicados permitirán tener un mejor control de los resultados individuales obtenidos por cada uno de los métodos, para poder identificar aquellas situaciones anómalas en las cuales se obtienen datos discrepantes ("outliers"). Otro aspecto a considerar en la planificación del experimento, es que las diferentes muestras deben ensayarse en diferentes corridas realizadas en diferentes días, para minimizar el

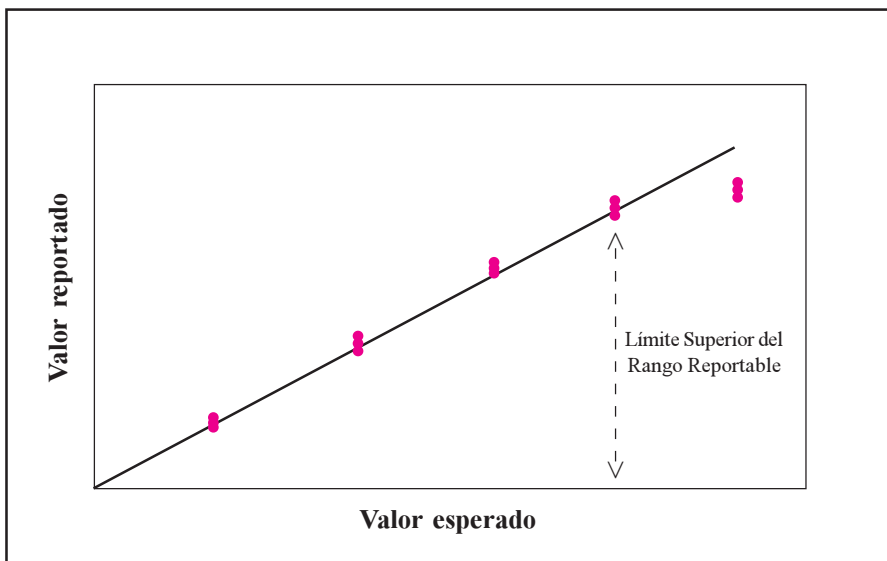


Figura 1

error sistemático que pueda provenir de una única corrida. Un mínimo de 5 días es lo recomendado, pero de ser posible, este tiempo debe ser extendido. Este hecho obliga a su vez a tener en cuenta otro aspecto que es el relacionado con la estabilidad de las muestras, ya que de lo contrario, las diferencias observadas, podrán deberse a un incorrecto manejo de las mismas y no a errores analíticos sistemáticos entre los métodos.

Para el análisis de los datos es de suma utilidad el empleo de gráficos contruidos a partir de los resultados obtenidos para ambos métodos. Los gráficos más frecuentemente empleados son: el Gráfico de diferencias y el Gráfico de comparación.

El Gráfico de diferencias muestra la diferencia entre el valor obtenido por el método en estudio menos el de comparación en el eje de las ordenadas versus el valor del método de comparación en el eje de las abscisas, tal como se muestra en la Figura 2. Estas diferencias deben distribuirse alrededor de la línea correspondiente a la "diferencia cero". De esta manera puede detectarse algún "outlier" que estará notablemente fuera de la nube de puntos, así como también si existe una tendencia marcada que evidencie alguna relación entre las diferencias en relación con la concentración de las muestras. A menudo es útil trazar en el gráfico las líneas correspondientes a los límites mínimo y máxi-

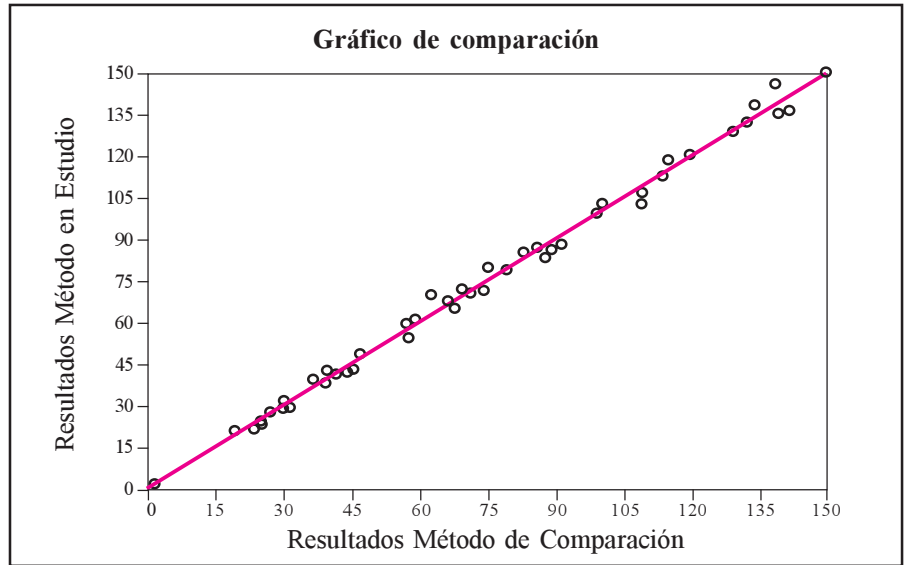


Figura 3

mo aceptables que deben ser establecidos de antemano.

En el gráfico de Comparación (Figura 3), se grafican los valores del método en estudio (ordenadas) en función de los obtenidos por el método de comparación (abscisas). Si además se traza una línea recta que se ajuste lo mejor posible a la totalidad de los puntos, de la simple inspección visual se pueden ir sacando algunas conclusiones acerca de cómo es la relación general entre ambos métodos, de la linealidad de respuesta en todo el rango estudiado, de la presencia de valores muy discrepantes, etc.

Además de las observaciones que puedan surgir de la simple inspección visual

de los gráficos descritos más arriba, se pueden estimar numéricamente los errores existentes empleando cálculos estadísticos apropiados. La aplicación de un análisis de regresión lineal permitirá el cálculo de la pendiente y la ordenada al origen de la recta de mejor ajuste, como estimadores del error sistemático proporcional y constante respectivamente; al mismo tiempo que el parámetro $S_{y/x}$ nos dará idea del grado de dispersión de los puntos alrededor de esa recta. El error sistemático (ES), a un dado nivel de decisión médica (X_c), puede entonces ser calculado empleando el valor Y_c que surge de la recta de regresión aplicando la siguiente expresión:

$$Y_c = a + b X_c$$

$$ES = Y_c - X_c$$

En donde a y b son la ordenada al origen y la pendiente respectivamente de la recta de regresión que mejor ajusta a los puntos.

Otro parámetro de gran importancia al hacer un estudio de regresión lineal es el coeficiente de correlación "r", cuyo significado es a menudo mal interpretado. Un buen coeficiente "r", con un valor muy próximo a 1, indica que el rango de datos es lo suficientemente amplio como para proveer estimaciones confiables de la pendiente y la ordenada al origen. No debe interpretarse a "r" como un índice que permite juzgar a un método como aceptable o no.

Por esta razón y para aquellas determi-

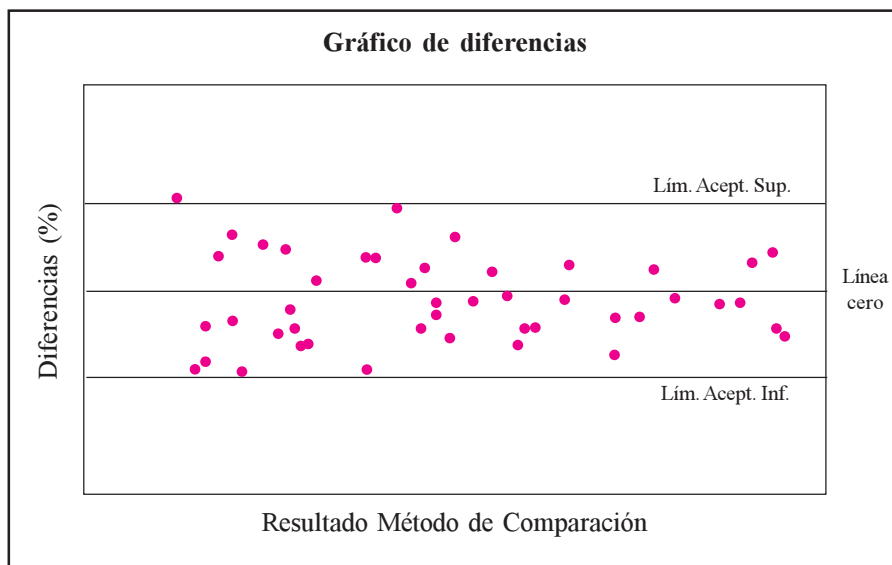


Figura 2

naciones que cubren un rango analítico muy estrecho (por ejemplo sodio y calcio), es más conveniente trabajar con el promedio de las diferencias entre resultados (bias promedio) y aplicar otros métodos estadísticos como por ejemplo el Test T para muestras apareadas. Estos cálculos utilizan también el desvío estándar de esas diferencias, un "valor t" y sirven para concluir si realmente esa diferencia entre los métodos es significativa desde un punto de vista estadístico.

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.



Agenda de Congresos

Argentina

- ✓ Expo CALILAB 2006

Hotel Intercontinental Buenos Aires - Moreno 809 - C1091AAQ

Buenos Aires, 24 al 26 de agosto de 2006

Organiza

Fundación Bioquímica Argentina (FBA)

Informes

Viamonte 1167 - 3° piso - C1053ABW, Buenos Aires

TE: 54 341 4374 6295 o 4373 5659/5674

calilabIV@fba.org.ar

www.fba.org.ar/calilab

- ✓ XVI Jornadas Bioquímicas del NOA

Hotel Carlos V

Santiago del Estero, 14 al 16 de Setiembre de 2006

Organiza

Colegio de Bioquímicos de Santiago del Estero

25 de Mayo 228 - Tel. 0385 421-9513/422-4571

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/

Brasil

- ✓ 39° Congreso Brasileiro de Patologia Clínica / Medicina Laboratorial

19 al 22 de Setiembre de 2006

Organiza

Sociedade Brasileira de Patologia Clínica

Informes

www.sbpc.org.br

Colombia

- ✓ VII Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriólogos

Bogotá, del 13 al 16 de octubre de 2006

Organiza

Colegio Nacional de Bacteriólogos

Informes

septimocongresocnb@colegionacionaldebacteriologos.org.co

www.olegionacionaldebacteriologos.org.co

